

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 novembre 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/83747 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17, G01N 33/569

(74) Mandataires : **PEAUCELLE, Chantal** etc.; Cabinet Ar-
mengaud Aine, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01336

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 30 avril 2001 (30.04.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/05535 28 avril 2000 (28.04.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **LEBLANC,**
Pascal [FR/FR]; 121 Grande Rue de Saintclair, F-69300
Caluire (FR). **DARLIX, Jean-Luc** [FR/FR]; Les Genets,
F-69630 Chaponost (FR). **GABUS-DARLIX, Caroline**
[FR/FR]; Les Genets, F-69630 Chaponost (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.



WO 01/83747 A2

(54) Title: PRION PROTEINS AND THEIR USES

(54) Titre : PROTEINES A PRIONS ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns isolated human or animal prion proteins PrP^c or PrP^{sc} capable of being fixed to DNA or RNA, in particular viral DNA or RNA and preferably to DNA or RNA of human or animal retrovirus. The invention also concerns the biological uses of said products.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à des protéines à prion PrP^c ou PrP^{sc}, humaines ou animales isolées qui sont capables de se fixer à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier à de l'ADN ou à de l'ARN viral et de préférence à de l'ADN ou à de l'ARN de rétrovirus humains ou animaux, et est relative aux applications biologiques de ces produits.

"Protéines à prions et leurs utilisations"

Les prions sont des agents transmissibles non conventionnels responsables d'encéphalites subaiguës spongiformes. Les maladies associées à ces agents ont été appelées maladies à prions, en référence à une protéine appelée protéine à prion (PrP).

Les maladies à Prions sont des maladies neurodégénératives fatales comme les maladies de Creutzfeld-Jacob (CJD), de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnie fatale familiale (FFI) et la maladie de Kuru chez les humains ; l'encéphalite spongiforme bovine (BSE) et la scrapie du mouton chez les animaux.

Les maladies à prions peuvent être infectieuses (maladie de Kuru, maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogénique (CJD), BSE), sporadiques (maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD)) et génétiques (Creutzfeldt-Jakob familial (CJD familial), maladie de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnie familiale fatale (FFI)).

- CJD familial : dans cette maladie, une mutation de la PrP est liée à un variant familial hétérozygote (codon 129 Met/Val). Un mélange de forme sauvage et mutée existe (Silvestini MC et al., Nat Med 1997 3 : 521). L'hétérogénéité phénotypique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sCJD) est bien documentée mais il n'y a pas encore de classification systématique des variants de la maladie (Parchi P et al., Ann Neurol 1999 46 : 224).

- GSS est un désordre hérité rare dû à différentes mutations dans le gène humain PrP qui code pour la PrP et qui se manifeste, entre autre, par la mutation d'un acide aminé P102L (Manson et al., Embo J 1999 18 : 6855). La maladie est caractérisée par l'accumulation de dépôts abondants d'une protéine anormale PrP^{Sc} dans la substance grise du cerveau.

- L'insomnie familiale fatale est un autre désordre dû à la mutation du codon 178 du gène *PrP* (Keohane C, Clin Exp Pathol 1999, 47 : 125). Le codon 129 est spécialement impliqué dans la susceptibilité à cette maladie. Des essais ont été réalisés pour corrélér la neuropathologie avec le génotype du codon 129 et le type de *PrP* pour établir une classification moléculaire (Mikol J, BiomedPharmacother 1999, 53 : 19).

Toutes ces maladies résultent en une dégénérescence progressive du cerveau entraînant la mort. Les principales caractéristiques des maladies à prions sont : l'astrocytose, la perte neuronale, la spongiose et la gliose de façon inconstante, la présence de plaques de fibrilles amyloïdes et différents dépôts d'anticorps anti-*PrP*.

La protéine *PrP* humaine est codée par un seul gène localisé sur le chromosome 20 et est présente chez de nombreux vertébrés et invertébrés. 32 séquences de *PrP* ont été décrites (Kutznetsov IB et al., Febs Lett 1997, 412 : 429 ; Kaluz S et al., Gene 1997 199 : 283). La *PrP* est composée de 253 acides aminés avec des répétitions N-terminales et deux sites potentiels de glycosylation. La protéine humaine mature est une protéine hydrophobe constituée des résidus d'acides aminés 23 à 231 et a un poids moléculaire apparent de 19 à 33-35 kDa. La structure tridimensionnelle de la protéine *PrP* normale cellulaire recombinante (acides aminés 23-230) est composée d'un domaine globulaire (résidus 125-228) et d'une queue N-terminale flexible ; le domaine globulaire contient 3 hélices α et un court feuillet β anti-parallèle (Zahn R et al., PNAS 2000 97 : 145). Les hélices α ont certaines propriétés d'hydrophobicité, de distribution de charges qui les rendent uniques parmi les hélices alpha généralement rencontrées. Malgré d'intenses recherches ces trois dernières décennies, aucun acide nucléique n'a été trouvé dans les prions, ce qui

tend à penser qu'il s'agit d'agents différents des virus et des viroïdes. La glycoprotéine est présente dans différentes cellules, et est en particulier exprimée constitutivement à la surface des neurones (Sakaguchi S et al., Nature 1996 380 : 528), des cellules gliales, des cellules folliculaires dendritiques (Brown KL et al., Nat Med 1999, 5 : 1308). Elle est attachée à la membrane cellulaire par une séquence d'ancrage glycosylphosphatidylinositol. Des observations suggèrent l'existence de glycoformes de PrP spécifiques de type cellulaire qui peuvent déterminer la susceptibilité cellulaire de l'infection par l'agent du prion (Dodelet VC et al., Blood 1998, 91 : 1556).

Plusieurs études suggèrent que la protéine PrP peut adopter deux conformations stables, la conformation dite " normale " (PrP^C) sensible aux protéases qui peut être recyclée et dégradée, et une forme dite " anormale " (PrP^{SC}) partiellement résistante à la protéinase K. Il n'y a aucune différence de séquences primaire et secondaire entre les protéines PrP^C et PrP^{SC} (Dormont D, Rev Neurol 1998, 154 : 142 ; Riek R et al., PNAS 1998, 95 : 11667). Par contre, elles auraient des structures tertiaires différentes. La conformation native et normale de PrP^C est composée d'un domaine N-terminal pauvrement structuré avec des hélices α en C-terminal tandis que la conformation anormale PrP^{SC} est composée de feuillets β à la place d'hélices α . La séquence 121-231 de PrP^{SC} contient deux feuillets β antiparallèles et 3 hélices α . Ce domaine contient la plupart des mutations ponctuelles qui ont été liées à l'apparition de maladies familiales à prions (Riek R et al., Nature 1996, 382 : 180). Grâce à sa structure en feuillets β , la protéine PrP^{SC} présente la capacité de former des dépôts d'agrégats fibrillaires, cette structure étant acquise avant la formation de multimères. Le modèle de β -nucléation propose que la PrP^{SC} s'organise en agrégats avec un core hydrophile qui

consiste en un arrangement des composants de l'hélice α de type feuillets β (Morrissey MP et al., PNAS 1999, 96 :11293). D'une façon générale, les protéines qui possèdent dans leur structure des éléments répétitifs peuvent adopter des conformations riches en feuillets β .; d'où des mutations protéiques qui induisent ces éléments répétitifs entraînent un changement de structure protéique qui peut aboutir à la formation d'agrégats (Liu JJ et al., Nature 1999 400 : 573). Les protéines PrP^{Sc} peuvent s'agréger mais également se fixer à la PrP^C. Cette fixation sélective supporte l'idée que PrP^C sert de ligand critique et/ou de récepteur pour PrP^{Sc} et inversement (Horiuchi M et al., Embo J 1999, 18 : 3193).

La protéine anormale PrP^{Sc} pourrait se former à partir de la forme normale PrP^C, grâce à un processus de trans-conformation (Liautard JP, J Soc Biol 1999, 193 : 311 ; Brockes JP, Curr Opin Neurobiol 1999, 9 :571). Mais ce qui initie cette conversion reste inexpliqué. Il existe différents facteurs qui influencent et/ou favorisent cette conversion. Les structures primaire et secondaire de la protéine pourraient par exemple influencer la conversion avec la présence ou l'absence de mutations et la conservation du pont disulfure (C178-C213) qui stabilise la conformation de la protéine en reliant les hélices α C-terminales, respectivement (Herrmann LM et al., Neuroreport 1998, 9 : 2457 ; Chen SG et al., Nat Med 1997 3 : 1009). Toute mutation touchant ce pont disulfure entraîne des anomalies sévères du routage intracellulaire de la protéine (Yanai A. et al., Febbs Lett 1999 460 :11). La topologie et les conditions de glycosylation de la protéine acquises dans le réticulum endoplasmique pourraient également être impliquées dans un phénomène de neurodégénération (Ma J et al., Nat Cell Biol 1999, 1 :358 ; Hegde RS et al., Science 1998, 279 : 827). La régulation de la topologie de la PrP dans le réticulum endoplasmique se fait grâce à des facteurs trans

qui peuvent fonctionner comme " Molecular Switch " pour donner aux protéines des conformations différentes avec des conséquences fonctionnelles différentes (Hegde RS et al., Mol Cell 1998 2 :85). Les facteurs trans peuvent être des lipides et/ou des enzymes. Les sphingolipides et surtout la sphingomyéline jouent un rôle essentiel dans les mécanismes post-traductionnels de la PrP qui conduisent à la PrP^{SC} ; le taux de PrP^{SC} semble être inversement corrélé à celui des sphingomyélines (Naslavsky N et al., J Biol Chem 1999 274 : 20763 ; Morillas M. et al., J Biol Chem 1999, 274 : 36859). Les enzymes, entre autres, la N-acétylglucosaminyltransférase III (GnTIII) présentent des différences d'activité enzymatique vis-à-vis de la protéine PrP^C dans le réticulum endoplasmique, entraînant la formation de PrP^{SC}. Dans les cellules dans lesquelles les protéines PrP^{SC} seraient produites, la machinerie intracellulaire de glycosylation serait perturbée (Rudd PM et al., PNAS 1999 96 : 13044).

La protéine cellulaire normale PrP est hautement conservée chez les vertébrés et invertébrés mais son rôle physiologique et/ou pathologique est encore inconnu. Etant donné son caractère ubiquitaire dans le règne animal, son rôle pathologique est extrêmement difficile à caractériser et à mettre en évidence. A travers la bibliographie, de nombreuses fonctions sont discutées, mais sans qu'aucune ne soit vraiment démontrée ni ait de pertinence biologique par rapport à une pathologie. On peut émettre par exemple l'hypothèse que la perte de fonction normale de la protéine contribue au développement d'une pathologie, bien que cela n'ait jamais été démontré. De même, la fonction biologique de PrP^C reste inconnue. Il a été décrit que PrP^{SC} possède une neurotoxicité *ex vivo* pour des neurones et des cellules de la microglie en culture. La séquence en acides aminés qui possède la toxicité optimale correspond à AGAAAAGA ; elle est nécessaire mais non suffisante pour induire la neurotoxicité, et nécessaire pour

se fixer aux neurones (Brown DR, Mol Cell neurosci 2000 15 : 66). Ce peptide induit l'apoptose neuronale à travers différents mécanismes, notamment en augmentant le flux de calcium (Brown DR et al., Eur J Neurosci 1997 9 : 1162 ; Herms JW et al., Glia 1997 21 : 253).

Les fonctions physiologiques et pathologiques des protéines PrP^{sc} et PrP^{sc} étant inconnues, les mécanismes des maladies dites à prions restent donc encore une énigme pour la communauté scientifique.

Il est admis aujourd'hui que les maladies associées à la PrP résultent directement de l'accumulation d'une forme anormale de la protéine dans le tissu nerveux et particulièrement dans le cerveau (Griffith JS Nature 1967, 215 : 1043, Prusiner SB Biochemistry 1982, 21 : 6942). La neurodégénérescence nécessite le dépôt de l'isoforme anormale de la protéine PrP^{sc}. Certaines mutations héritées semblent causer également la neurodégénérescence en absence de l'isoforme anormale, en favorisant la synthèse d'une forme transmembranaire de PrP (CtmPrP) dont la cinétique d'accumulation est très étroitement liée à l'évolution de la maladie (Hegde RS et al., Nature 1999 402 : 822). Différents groupes ayant produit des souris n'exprimant pas de PrP ont apporté des preuves expérimentales qui indiquent que les souris ne développent jamais la maladie après injection d'extraits de cerveaux de malades où la PrP^{sc} s'accumule et qu'il faut une expression préalable et/ou présence de PrP^{sc} dans le cerveau (Borchelt DR et al., Chem Biol 1996, 3 : 619).

La transmission des maladies à prions peut être génétique et/ou infectieuse. Dans le cadre d'une transmission infectieuse, le mécanisme de propagation dans le cerveau n'est pas clair. Les maladies sont probablement transmises par voie orale ou par d'autres voies périphériques. Il est admis que

les prions sont transmissibles (Prusiner SB, PNAS 1998 95 : 13363), sont présents sur des sites périphériques et peuvent être transportés jusqu'aux cellules des tissus nerveux (neurones et cellules de la microglie) (Aguzzi A et al., Cell Mol Life Sci 1997 53 : 485) par propagation hématogène ou par propagation neuronale, ou transport axonal (Peurin JM et al., Neuroreport 1999 10 : 723 ; Baker CA et al. J. Virol. 1999 73 : 5089 ; Rodolfo K et al., Neuroreport. 1999, 10 : 3639 ; Race R et al., J Virol 2000 74 : 828 ; Ma et al. Nat ; Med. 1998, 4 : 1429).

Certains auteurs pensent que la maladie se transmet par la PrP seule. Ils sont convaincus que l'agent pathogène infectieux est une PrP anormale qui pénètre dans le cerveau sain et pourrait se fixer à la PrP normale et modifier sa forme ou pourrait activer des enzymes qui modifient la structure de la PrP. Ainsi, la PrP^{Sc} serait dite infectieuse par elle-même. Le cerveau qui n'a pas de PrP^C ne serait pas endommagé par une PrP^{Sc} exogène (Brandner S et al., Nature 1996 379 : 339). Mais d'autres chercheurs estiment que cette hypothèse est peu plausible et que l'acquisition de la résistance aux protéases par la PrP n'est pas suffisante pour expliquer la propagation de l'infection (Dormont J. et al., Science 1998 ; Hill AF et al., J Gen Virol 1999, 80 : 11) car il existe des souches différentes de prions probablement génétiques et il n'a jamais été démontré que les protéines pouvaient être des supports d'information génétique.

D'autres équipes émettent l'hypothèse que les maladies associées à la PrP pourraient nécessiter la présence d'autres facteurs (Manuelidis L Ann NY Acad Sci 1994, 724 : 259, Manuelidis L PNAS 1995, 92 : 5124). Ces équipes travaillant sur le sujet ont évoqué la participation de particules rétrovirales de type IAP dans la transmissibilité des maladies à prions, mais d'une part l'utilisation des modèles animaux a

contribué à mettre en cause des contaminations et d'autre part, un rôle de ces éléments n'a jamais pu être démontré et encore moins expliqué

5 Les présents inventeurs ont maintenant montré de manière surprenante que la PrP (PrP^C ou PrP^{Sc}), d'origine humaine ou animale était capable de se fixer à des acides nucléiques (ADN, (ADNc ou ADN génomique) ou ARN (ARNm ou tARN)), de préférence viraux ou rétroviraux, mais également à elle-même
10 ou à la protéine de nucléocapside d'un rétrovirus humain ou animal, et qu'elle possède toutes les propriétés des protéines de la nucléocapside des rétrovirus, qui se fixent aux acides nucléiques viraux. Les protéines de la nucléocapside des rétrovirus sont des molécules chaperonnes qui assurent les
15 fonctions essentielles dans la formation des virus, la transcription inverse du génome rétroviral et sa stabilité (Darlix JL et al. J. Mol. Biol., (1995) 254 :523).

Plus précisément, la PrP (PrP^C ou PrP^{Sc}), est capable de se
20 fixer aux ARNs (de transfert, de structure), en particulier aux ARNs viraux ou rétroviraux et également aux ADNs simple et double brin(s) ainsi qu'aux ADNc et à la nucléocapside.

Les inventeurs ont montré notamment que la PrP humaine (huPrP)
25 interagit fortement avec les ARN et ADN en formant des complexes nucléoprotéiques, qui ressemblent aux complexes formés entre la protéine de la nucléocapside NCp7 de HIV-1 et l'ADN de HIV-1 (Darlix JL et al. J. Mol. Biol., (1995) 254 :523 ; Darlix JL et al. Acad. Sci. III (1993) 316 :763 ;
30 Braat C et al. Embo. J. (1989) 8 : 3279).

Pour examiner la signification biologique de ces complexes PrP - acides nucléiques, les inventeurs ont comparé les conséquences de cette fixation avec celles de la fixation entre acides nucléiques et NCp7, qui est essentielle pour la
35 réplication rétrovirale (Darlix JL et al. J Mol Biol 1995,

254 : 523). Comme la protéine de la nucléocapside de HIV-1 (NCp7) :

- huPrP, en se fixant aux ARNs, facilite la dimérisation de l'ARN de HIV et l'hybridation du tARN amorce au site d'initiation de la transcription inverse (PBS) ;
- huPrP chaperonne les transferts de brins d'ADN moins (-) et plus (+) qui ont lieu pendant la synthèse de l'ADN proviral par la transcriptase inverse (RT) et qui sont essentiels pour générer les " Long Terminal Repeat " (LTR) de l'ADN proviral ;
- huPrP se fixe à la nucléocapside NCp7 de HIV-1.

Ces résultats suggèrent qu'au moins une des fonctions majeures de la PrP est de se fixer aux acides nucléiques viraux et d'agir comme une nucléocapside rétrovirale, comme montré par les inventeurs, et qu'une des fonctions naturelles de la PrP est liée au métabolisme des acides nucléiques.

Les inventeurs ont mis en évidence que les propriétés de fixation aux acides nucléiques et de chaperonne de la PrP sont peu altérées par un traitement à la chaleur. En particulier, ces propriétés sont conservées après chauffage à environ 95°C pendant 2 à 5 min. Une grande résistance à pH basique, notamment à un pH de 13, a également été observée.

En parallèle, les inventeurs ont montré la présence de huPrP dans des virions hautement purifiés de HIV-1, de SIV, du virus de la rougeole, produits *in vitro* par des cellules infectées ou *in vivo* dans des tissus. La présence de cette protéine dans les particules virales suggère que la protéine est encapsidée dans les particules. Les inventeurs ont formulé et vérifié cette hypothèse en montrant qu'une PrP, exprimée dans des cellules infectées par un rétrovirus est encapsidée dans les nouvelles particules rétrovirales formées en interagissant avec la nucléocapside ou l'acide nucléique rétroviral. Ainsi,

les nouvelles particules rétrovirales formées peuvent infecter à leur tour d'autres cellules, d'un même organisme ou d'un organisme différent, et libérer la PrP dans la cellule nouvellement infectée, assurant la transmission d'une
5 infection. Il est en effet admis que la PrP et, préférentiellement la PrP^{sc}, est l'agent responsable des maladies à prions, lorsqu'elle est présente dans un tissu humain ou animal et peut convertir la PrP^c en PrP^{sc}. Les travaux des inventeurs montrent que la PrP, est véhiculée par
10 une particule rétrovirale et apportent une explication nouvelle, cohérente et innovante à la transmissibilité ou transmission des protéines PrP, et donc des maladies à prions.

Les inventeurs ont montré que la surexpression de PrP dans
15 différentes lignées cellulaires conduit à une forte atténuation de la production de virions et de l'infectivité rétrovirale, en particulier des rétrovirus HIV et SIV produits par les cellules desdites lignées cellulaires.

20 Ces résultats suggèrent au moins qu'une autre des fonctions majeures de huPrP est d'interférer avec la réplication et l'infectivité des rétrovirus. Ainsi, PrP peut être considérée comme un système de défense de l'organisme contre toute infection rétrovirale.

25 Aussi, la présente invention a pour objet une PrP (PrP^c ou PrP^{sc}) isolée, humaine ou animale, capable de se fixer un acide nucléique (ADN ou ARN), en particulier viral, et de préférence rétroviral, tel que à l'ARN ou à l'ARN des rétrovirus HIV-1
30 (groupe M, groupe O, groupe non M non O), HIV-2, les virus enveloppés, tel que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

L'invention a notamment pour objet les formes de huPrP de 19
35 kDa correspondant à huPrP (27-30) et de 10 kDa correspondant

aux résidus 100 à 200. Elle vise en particulier des protéines correspondant à la partie N-terminale non structurée de ces protéines, allant de la position 23 à 145 sur la séquence donnée sur la figure 8.

- 5 Selon un autre aspect, l'invention vise des analogues de Ncp7 caractérisés en ce qu'il s'agit d'une PrP isolée, ou de ses fragments comme défini plus haut.

En se fixant aux acides nucléiques (ARNs viraux) la PrP d'origine humaine ou animale facilite la dimérisation de l'ARN
10 viral et l'hybridation du tARN amorce au site d'initiation de la transcription inverse (PBS) ; dirige les transferts des brins ADN (-) et ADN (+) qui ont lieu pendant la synthèse de l'ADN proviral par la transcriptase inverse et qui sont essentiels pour générer les LTRs du provirus.

- 15 L'invention a donc également pour objet les complexes nucléoprotéiques isolés, comprenant une PrP (PrP^c ou PrP^{sc}) humaine ou animale associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier viral, et de préférence de rétrovirus humains ou animaux.

- 20 Les inventeurs ont également montré que PrP (PrP^c ou PrP^{sc}) était capable de se fixer à une protéine de nucléocapside rétrovirale. L'invention a donc aussi pour objet une protéine à prion (PrP^c ou PrP^{sc}), humaine ou animale, capable de se fixer à elle-même ou à une protéine de nucléocapside d'un
25 rétrovirus humain ou animal, en particulier à la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1 et les complexes protéiques isolés ainsi formés.

- L'invention concerne également l'utilisation d'une PrP (PrP^c ou PrP^{sc} modifiée, c'est à dire modifiée de façon à ce qu'elle
30 n'induisse pas une maladie dite à prions), ou d'un fragment d'au moins une desdites protéines comme agent antiviral, éventuellement en interaction avec un ligand susceptible de se fixer à ladite PrP ou à ses fragments pour favoriser son activité anti-virale, en particulier une protéine ou un
35 polypeptide (telle que la PrP elle-même ou une protéine

susceptible de s'associer à la PrP ou un fragment desdites protéines ou encore un anticorps dirigé contre un virus), un acide nucléique (en particulier un acide nucléique viral et de préférence rétroviral), une molécule chimique ou une drogue, en particulier un agent anti-viral, tel que l'A.Z.T (Azido Deoxythymidine), D.D.I (DiDeoxyInosine), D.D.C (DiDeoxyCytosine), un vecteur, c'est à dire un complexe macromoléculaire permettant de délivrer une substance thérapeutiquement active, tel qu'un liposome, un vecteur viral et toutes autres molécules susceptibles d'agir comme agent anti-viral ; ainsi que l'utilisation d'un acide nucléique codant pour au moins un fragment d'au moins une desdites protéines désignées ci-dessus par le terme générique PrP, comme agent anti-viral, ainsi que les compositions thérapeutiques et/ou prophylactiques comprenant, entre autres, un desdits agents anti-viraux précités. Dans ces compositions thérapeutiques et/ou prophylactiques, l'agent anti-viral, utilisé en quantité thérapeutiquement efficace, est éventuellement avec un adjuvant et/ou un diluant et/ou un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.

Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité

Il en est de même pour les autres compositions thérapeutiques et/ou prophylactiques selon l'invention. En effet, les inventeurs ont montré que la surexpression d'une PrP humaine recombinante, dans différentes lignées cellulaires infectées par le virus HIV ou par le virus SIV avait comme conséquence

une diminution de la production de particules rétrovirales et une forte atténuation de l'infectivité des particules virales *in vitro* au sein de ces cultures.

On entend par PrP, dans la description et les revendications
5 toute molécule normale ou pathologique, mutée ou non, de conformation physiologique ou non, appartenant à la famille des protéines à prions, de quelque origine que ce soit, cette définition incluant les protéines qui présentent un pourcentage d'homologie ou d'identité par rapport à une
10 séquence protéique de référence donnée dès lors qu'elles possèdent les propriétés de fixation aux acides nucléiques et à une protéine de nucléocapside, telles que mises en évidence dans les exemples. Les définitions de la PrP (PrP^c et PrP^{sc}) incluent les protéines naturelles purifiées, les protéines
15 recombinantes, les polypeptides de synthèse, ou des fragments desdites protéines dans la mesure où ils présentent les propriétés rappelées plus haut, ces protéines ou fragments de protéines étant obtenus par des techniques conventionnelles bien connues de l'homme du métier. Entrent notamment dans ces
20 fragments, les formes de 19 et 10 kDa évoquées ci-dessus et le domaine N-terminal lesdites protéines et fragments. Les séquences desdites protéines PrP (PrP^c et PrP^{sc}) d'origine humaine ou animale sont répertoriées sur la figure 8, ainsi que les séquences nucléiques codant pour lesdites protéines.
25 Ces protéines comprises dans une composition thérapeutique seront ensuite administrées *in vivo* à l'homme ou à l'animal pour se fixer à des acides nucléiques viraux, comme décrit précédemment, et ainsi diminuer la production de particules virales infectieuses et abaisser l'infectivité desdites
30 particules rétrovirales.

L'invention concerne donc une composition thérapeutique et/ou prophylactique qui comprend, entre autres, (i) une cassette d'expression fonctionnelle dans une cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote permettant l'expression de
35 l'ADN ou de l'ARN ou d'un fragment d'ADN ou d'ARN, codant pour

- tout ou partie d'une protéine PrP^c ou PrP^{sc} modifiée et, éventuellement permettant l'expression de l'ADN ou de l'ARN, ou d'un fragment d'ADN ou d'ARN, codant pour tout ou partie d'un ligand de ladite PrP^c ou PrP^{sc} modifiée, placé sous le
- 5 contrôle des éléments nécessaires à son expression ; (ii) un vecteur comprenant une telle cassette d'expression ou (iii) une cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote comprenant une cassette d'expression ou un vecteur, tels que définis ci-dessus.
- 10 De nombreuses cassettes d'expression pour la production de protéines d'intérêt dans des cellules procaryotes ou eucaryotes sont décrites dans la littérature, en particulier dans des cellules eucaryotes. D'une manière générale, une
- 15 région promotrice est localisée dans la région flanquante 5' des gènes et comprend le jeu d'éléments nécessaires à la transcription du fragment d'ADN placé sous leur contrôle. Une région promotrice peut également consister en un assemblage d'éléments de diverses origines qui sont fonctionnels dans la cellule hôte, tels que, par exemple, une région promotrice
- 20 minimale comprenant la " TATA box " et le site d'initiation de la transcription et les régions localisées en amont de la "TATA box " qui permettent d'obtenir un niveau de transcription approprié.
- 25 Par cellule issue d'un organisme eucaryote, on entend notamment les cellules issues de levures (par exemple issues de *Schizosaccharomyces pombe* ou de *Saccharomyces cerevisiae*), les cellules souches humaines ou induites, les cellules HeLa, les cellules 293, les cellules COS, les cellules Vero et les
- 30 cellules CHO.
- L'invention concerne aussi une cassette d'expression fonctionnelle dans un vecteur viral fonctionnel pour transduire des cellules d'un organisme eucaryote permettant l'expression de l'ADN ou de l'ARN, ou d'un fragment d'ADN ou
- 35 d'ARN, codant pour tout ou partie d'une protéine PrP^c ou PrP^{sc}

modifiée, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et permettant la répllication d'un acide nucléique viral recombinant, en particulier rétroviral, tel que les acides nucléiques des virus HIV-1 de groupe M, de
5 groupe O, de groupe non M non O, du virus HIV-2, du SIV, des virus enveloppés tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus ; un vecteur comprenant ladite cassette d'expression ; une cellule transformée, issue d'un organisme procaryote ou eucaryote,
10 comprenant une cassette d'expression et de répllication ou un vecteur, tels que définis ci-dessus ; lesdites cellules étant notamment choisies parmi les cellules eucaryotes 293, les cellules HeLa et HeLa P4, les cellules souches humaines ou animales ; ainsi qu'une composition thérapeutique et/ou
15 prophylactique, comprenant, entre autres, une telle cellule transformée, un tel vecteur ou une cassette d'expression telle que définie ci-dessus ; ainsi que leurs utilisations comme agents anti-viraux.

La résistance à la chaleur des propriétés de fixation aux
20 acides nucléiques et de chaperonne de la PrP, telle qu'évoquée ci-dessus, est avantageusement mise à profit, conformément à l'invention, dans des tests de détection de PrP, réalisés sur un échantillon biologique humain ou animal, tel qu'un fluide biologique, une cellule ou un fragment tissulaire, qu'on
25 soumet à un traitement thermique aux fins de dénaturation d'au moins la majeure partie des protéines de l'échantillon et on récupère la PrP qui, comme indiquée plus haut, résiste à un tel traitement.

30 Un autre objet de l'invention est un procédé de détection et/ou de quantification d'une infection par un virus, en particulier un rétrovirus humain ou animal, selon lequel :

(i) on prélève un échantillon biologique humain ou animal, tel qu'un fluide biologique, une cellule ou un fragment tissulaire,

5 (ii) on détecte une PrP^C ou PrP^{Sc} dans ledit échantillon biologique, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 de HIV-1,

10

(iii) on détecte ladite PrP^C ou PrP^{Sc} de l'étape (ii), et

(iv) si souhaité on quantifie la concentration de ladite PrP^C ou PrP^{Sc} de l'étape (ii) par rapport à une concentration de
15 référence.

Selon ce procédé on détecte et éventuellement quantifie ladite PrP^C ou PrP^{Sc} sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou
20 associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale et en particulier à la nucléocapside NCp7 de HIV-1, à l'aide d'au moins un ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^C ou PrP^{Sc} sous forme libre ou dirigé
25 contre au moins un premier épitope de ladite PrP^C ou PrP^{Sc} associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral ou rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1. Eventuellement, on utilise un deuxième
30 anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope, différent dudit premier épitope, de ladite PrP^C ou PrP^{Sc} sous forme libre ou associée.

En effet, au cours d'une infection virale ou rétrovirale, la
35 PrP exprimée ou surexprimée peut non seulement se fixer à des

acides nucléiques viraux ou rétroviraux mais également à des acides nucléiques cellulaires.

Le procédé est de préférence un procédé dit de type sandwich, utilisant deux anticorps polyclonaux ou deux anticorps monoclonaux ou un anticorps polyclonal et un anticorps monoclonal, de préférence deux anticorps monoclonaux, dont l'un est fixé sur une phase solide (anticorps de capture) et dont l'autre est marqué par tout marqueur approprié (anticorps de détection). Le premier et deuxième anticorps tels que définis ci-dessus sont indifféremment un anticorps de capture ou de détection. Par ailleurs, par premier et deuxième anticorps on englobe également les fragments d'anticorps et les anticorps anti-complexe spécifiques du complexe protéine/protéine de nucléocapside, du complexe protéine/acide nucléique et dirigés contre ce complexe.

L'invention concerne aussi un kit pour la détection et/ou la quantification d'une infection par un virus, en particulier un rétrovirus humain ou animal, caractérisé en ce qu'il comprend, entre autres, au moins un ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} sous forme libre ou dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral, en particulier rétroviral ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier à la nucléocapside NCp7 de HIV-1, et éventuellement un deuxième anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope, différent dudit premier épitope, de ladite PrP^c ou PrP^{sc} sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN viral, en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier à la nucléocapside NCp7 de HIV-1. Les anticorps du kit répondent aux définitions données ci-dessus pour le procédé.

La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Des anticorps peuvent également être produits par immunisation de souris ou de lapins avec les particules virales de HBVm. Pour la production d'anticorps monoclonaux, l'immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quelque soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou la chromatographie d'affinité (protéine A ou G). Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de

dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on entend les
5 fragments F(ab)2, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal
of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science
242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend,
entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir
par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et
10 Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397), tel qu'un
anticorps humanisé.

L'anticorps monoclonal ou polyclonal, ou fragment desdits
anticorps, ainsi obtenu est utilisé dans un procédé de
15 diagnostic ou est incorporé dans une composition ou kit de
diagnostique.

L'invention concerne encore des particules virales isolées, en
particulier des particules d'un rétrovirus humain ou animal,
20 tel que le virus HIV-1 de groupe M, de groupe O, de groupe non
M non O, le virus HIV-2, le virus SIV, les virus enveloppés,
tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les
Filovirus et les Paramyxovirus, et comprenant une protéine PrP^c
ou une protéine PrP^{sc}, telle que définie précédemment.

25 Un autre objet de l'invention est un procédé de détection
et/ou de quantification d'une maladie à prions selon lequel :

(i) on prélève un échantillon biologique humain ou animal, tel
30 qu'un fluide biologique, une cellule ou un fragment
tissulaire,

(ii) on isole ou extrait et purifie des particules virales, en
particulier rétrovirales, à partir dudit échantillon
35 biologique,

(iii) on lyse lesdites particules virales de façon à obtenir un lysat, et

5 (iv) on détecte une PrP, de préférence la PrP^{sc}, dans ledit lysat, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou de l'ARN viral, en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier la nucléocapside NCp7 de HIV-1, et

10

(v) si souhaité, on quantifie ladite PrP, de préférence ladite PrP^{sc} sous forme libre ou associée ; lesdites particules virales répondant à la définition donnée précédemment.

15 Selon ce procédé, on détecte et éventuellement quantifie ladite PrP^{sc} sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN viral, en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier à la nucléocapside rétrovirale de HIV-1, à l'aide d'au moins un
20 ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^{sc} sous forme libre ou dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} associée à de l'ADN ou à de l'ARN viral, en particulier rétroviral ou associée à une
25 protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier à la nucléocapside rétrovirale de HIV-1 et, éventuellement on utilise un deuxième anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope rétroviral, différent dudit premier épitope, de ladite PrP^{sc} sous forme
30 libre ou associée.

De préférence, le procédé est un procédé dit de type sandwich utilisant deux anticorps soit polyclonaux, soit monoclonaux, soit un anticorps monoclonal et un anticorps polyclonal.

35

Un kit pour la détection d'une maladie à prions, comprendra, entre autres, au moins un ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope d'une PrP^{sc} sous forme libre ou dirigé
5 contre au moins un premier épitope de ladite PrP^{sc} associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier viral et de préférence rétroviral ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier à la nucléocapside rétrovirale de HIV-1 et éventuellement un deuxième anticorps, de préférence
10 un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope, différent dudit premier épitope, de ladite PrP^u ou PrP^{sc} sous forme libre ou associée.

Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux décrits ci-dessus
15 répondent à la définition donnée précédemment pour le procédé et le kit de détection et/ou de quantification d'une infection par un virus et englobent, entre autres, les fragments d'anticorps et les anticorps anti-complexe.

20 Le procédé et le kit de l'invention peuvent être utilisés, entre autres, pour la détection de la PrP^{sc} chez des animaux dont les carcasses sont destinées à préparer de l'alimentation pour le bétail.

25 D'une manière générale, les procédés de l'invention pour la détection et/ou la quantification d'une infection virale ou la mise en évidence d'une maladie à prions utilisent des protocoles bien connus de l'homme du métier, tels que les tests ELISA, les Western blots, l'immunofluorescence ou autres
30 technologies appropriées.

L'invention concerne également une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autres, un agent thérapeutique capable
35 d'empêcher la transmission d'une protéine PrP, de préférence

PrP^{sc}, par une particule virale, en particulier une particule rétrovirale telle que définie précédemment, éventuellement en interaction avec un agent anti-viral, tel qu'une molécule chimique, une drogue, un ligand susceptible de se lier à ladite PrP (de préférence PrP^{sc}) , un acide nucléique, un vecteur viral, lesdits agents anti-viraux répondant aux définitions données précédemment.

Par transmission ou transmissibilité, on entend la transmission d'une cellule à une autre cellule d'un même organisme ou d'organismes différents.

Par ailleurs, l'invention concerne une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique qui comprend, entre autres, un agent thérapeutique capable d'empêcher l'encapsidation d'une protéine PrP (de préférence PrP^{sc}) dans une particule virale, en particulier une particule rétrovirale telle que définie précédemment ou un agent thérapeutique capable d'empêcher la fixation d'une protéine PrP, éventuellement en interaction avec un agent anti-viral, tel qu'une molécule chimique, une drogue, un ligand susceptible de se lier à ladite PrP (de préférence PrP^{sc}), un acide nucléique, un vecteur viral ; ceux-ci répondant aux définitions données précédemment.

Enfin, l'invention concerne une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique qui comprend, entre autres, un agent thérapeutique capable d'empêcher la fixation d'une protéine PrP (de préférence PrP^{sc}) à un acide nucléique viral, en particulier rétroviral, éventuellement en interaction avec un agent anti-viral, tel qu'une molécule chimique, une drogue, un ligand susceptible de se lier à ladite PrP (de préférence PrP^{sc}), un acide nucléique, un vecteur viral qui répondent aux définitions données ci-dessus. Il est en effet présumé que c'est en se fixant aux acides nucléiques viraux ou à la

nucléocapside que la protéine entre majoritairement dans les particules virales.

L'agent thérapeutique est, par exemple, une molécule susceptible de d'empêcher l'encapsidation de la PrP et/ou son interaction avec des acides nucléiques, de préférence viraux, et/ou des nucléoprotéines et donc d'inhiber ou de réduire la transmissibilité de cette protéine associée à une maladie dite à prions ; en particulier un ligand capable de se lier à ladite PrP, de préférence PrP^{Sc}, en particulier un anticorps polyclonal ou monoclonal ou un fragment d'anticorps et de préférence un anticorps ou fragment d'anticorps monoclonal, ou est un acide nucléique codant pour un anticorps polyclonal ou monoclonal ou pour un fragment d'anticorps et de préférence pour un anticorps ou un fragment d'anticorps monoclonal, éventuellement en association avec un ou des agent(s) anti-viraux. La définition d'agent thérapeutique comprend également un acide nucléique ou un vecteur codant pour un ligand, tel que défini ci-dessus ou une cellule transformée ou transduite par ledit acide nucléique ou vecteur.

L'agent thérapeutique est également une molécule anti-virale, c'est à dire une molécule chimique, une drogue, une protéine, un acide nucléique, un vecteur d'expression contenant un acide nucléique codant pour une molécule anti-virale, une cellule transformée ou transduite par ledit vecteur. Par drogue ou molécule chimique on entend notamment les agents anti-viraux, tels que l'A.Z.T (Azido Deoxythymidine), D.D.I (DiDeoxyInosine), D.D.C (DiDeoxyCytosine), ainsi que toutes autres molécules susceptibles d'agir comme agent anti-viral.

L'invention concerne encore une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie à prions qui comprend une cassette d'expression fonctionnelle dans un vecteur viral fonctionnel

pour transduire des cellules issues d'un organisme eucaryote permettant l'expression de l'ADN ou d'un fragment d'ADN codant pour tout ou partie d'une protéine PrP^c ou PrP^{Sc} modifiée, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et
5 permettant la répllication d'un acide nucléique viral, en particulier rétroviral recombinant, tel que les acides nucléiques des virus HIV-1 de groupe M, de groupe O, de groupe non M non O, du virus HIV-2, du SIV, des virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les
10 Filovirus et les Paramyxovirus ou un vecteur comprenant une telle cassette d'expression ou une cellule transformée, issue d'un organisme eucaryote, comprenant une cassette d'expression et de répllication ou un vecteur, en particulier une cellule choisie parmi les cellules eucaryotes 293, les cellules HeLa
15 et HeLa P4, les cellules souches humaines ou animales.

L'invention concerne l'utilisation d'une composition thérapeutique et/ou prophylactique telle que définie ci-dessus ou d'un agent thérapeutique tel que défini précédemment , pour
20 le traitement et/ou la prévention d'une maladie à prions.

De telles compositions thérapeutique et/ou prophylactique sont utilisées pour le traitement ou la prévention d'une maladie à prions. Ces compositions se présentent par exemple sous forme
25 injectable pour être administrées dans un tissu, un fluide ou un organisme porteur de l'agent responsable de la maladie ou être injectée à titre préventif et l'invention concerne leur utilisation pour le traitement ou la prévention d'une maladie à prions. Ces compositions peuvent comprendre de plus un
30 adjuvant et/ou un diluant et/ou un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Par " véhicule pharmaceutiquement acceptable ", on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un
35 animal, tels que décrits par exemple dans Remington's

Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse. Les définitions des
5 excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité.

L'invention concerne donc aussi un procédé pour mettre en
10 évidence une surexpression de la protéine PrP (PrP^c ou PrP^{sc}) et la diminution d'une infection virale *in vitro*, en particulier une infection rétrovirale par un rétrovirus humain ou animal selon lequel :

- 15 (i) on transforme une cellule avec un acide nucléique codant pour un rétrovirus et un acide nucléique codant pour une PrP^c ou PrP^{sc} d'origine humaine ou animale, en particulier un plasmide,
- 20 (ii) on réalise une culture cellulaire de ladite cellule dans un milieu de culture approprié, on détecte la production de virions dans le surnageant de culture de ladite culture cellulaire et, (iii) on corrèle ladite production de virion avec une production de virion effectuée dans les mêmes
25 conditions mais en l'absence de PrP^c ou PrP^{sc}. En particulier, la cellule est notamment choisie parmi les cellules 293, les cellules HeLa et HeLa P4, les cellules souches humaines ou animales, et l'acide nucléique rétroviral est l'acide nucléique d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de
30 groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

L'invention concerne aussi un procédé de détection et/ou de
35 quantification de l'expression d'une protéine PrP^c ou PrP^{sc} et

de l'expression d'au moins une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus, selon lequel on utilise au moins un premier ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et au moins un deuxième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

Dans un mode de réalisation particulier on utilise un troisième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope, de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et/ou au moins un quatrième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier

d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

Un kit pour de détection et/ou de quantification de l'expression d'une protéine PrP^c ou PrP^{sc} et de l'expression d'au moins une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus, comprend au moins un premier ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et au moins un deuxième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus et dans un mode de réalisation préféré comprend également un troisième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope, de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou

associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et/ou au moins un quatrième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins
5 un deuxième épitope, différent du premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, le virus
10 BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

Les anticorps précités répondent aux définitions précédentes
15 et englobent, entre autres, les anticorps anti-complexe.

Enfin l'invention a pour objet un procédé de traitement thérapeutique d'une infection virale, selon lequel on administre à un être humain ou à un animal une protéine PrP^c ou
20 PrP^{sc} telle que définie précédemment comme agent anti-viral ou une composition thérapeutique consistant en une cassette d'expression fonctionnelle desdites protéines ou de leurs fragments, ou un vecteur comprenant une telle cassette d'expression ou encore une cellule comprenant une telle
25 cassette d'expression ou un tel vecteur . ainsi qu'un traitement d'une maladie à prions, selon lequel on administre l'homme ou à l'animal une composition comprenant un agent thérapeutique capable d'empêcher la transmission d'une protéine PrP(de préférence PrP^{sc}) par une particule virale et
30 de préférence rétrovirale, ou une composition comprenant un agent thérapeutique capable d'empêcher l'encapsidation d'une protéine PrP(de préférence PrP^{sc}) dans une particule virale (de préférence rétrovirale) ou une composition capable d'empêcher la fixation d'une protéine PrP (de préférence PrP^{sc}) à un acide

nucléique viral ou rétroviral dans une particule virale ou rétrovirale.

Définitions :

5

Acides nucléiques : Les molécules ou séquences d'acides nucléiques ADN ou ARN consistent en un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de synthèse, correspondant à un enchaînement
10 précis de nucléotides, modifiés ou non, et permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager. Les séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides aminés des
15 protéines ou de leurs fragments en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique, l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les molécules adaptées. Il peut
20 ainsi définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les molécules d'intérêt de l'invention ou de leur(s) fragments(s).

Vecteur : Ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux
25 séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur
30 transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée. Dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques " neutres " ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et
35 leurs utilisations sont décrites dans la littérature (voir par

exemple la demande de brevet PCT WO 94/29471). Les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible, ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

La séquence d'acide nucléique est de préférence une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acides nucléiques peut être sous la forme d'un " vecteur ", et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une séquence d'acide nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratiquement choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfonate, la diométhylformamide, le diméthylacétamide, la tétraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus. Ils peuvent également
5 permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments
10 intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir la demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines,
15 d'antigènes d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés. Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs permettent de
20 cibler les cellules soit par utilisation de molécule de ciblage introduite dans ou sur le vecteur, comme décrit ci-dessus, soit par utilisation d'une propriété particulière de la cellule.

25 Transformation cellulaire *in vitro* : Ainsi, dans un cas particulier, une cellule peut être modifiée *in vitro* par au moins (i) une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques
30 issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des molécules d'intérêt, d'un fragment de la molécule, d'une anticorps spécifique de la molécule qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de
35 mammifère ou sécrété par la cellule ; par au moins (ii) un

vecteur comprenant au moins un acide nucléique comme décrit en (i).

Plus particulièrement, ladite cellule est une cellule de mammifère et provient soit du mammifère à traiter, soit d'un mammifère autre que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont 10 préférentiellement CMHII+ ou CMHII- inductibles, comme les lymphocytes, les monocytes, les astrocytes, les oligodendrocytes.

Transformation de cellules *in vivo* et thérapie génique : Des 15 cellules peuvent être transformées *in vivo* après injection de vecteurs comprenant au moins un gène codant pour une molécule de l'invention et/ou pour un agent thérapeutique décrit dans la présente invention, pour la préparation d'une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique dite de thérapie 20 génique et ladite composition. Le vecteur comprend au moins des éléments assurant l'expression d'un gène *in vivo*.

Par éléments assurant l'expression d'un gène *in vivo*, on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer 25 l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit 30 polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV 35 (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine, les promoteurs du

gène codant pour la créatinine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

La composition comprend au moins un vecteur contenant un gène codant pour une molécule de l'invention et/ou pour un agent thérapeutique comme décrit, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène *in vivo*. L'avantage repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées chez le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques comprenant les gènes qui codent pour les agents thérapeutiques sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transformer ou "transfecter" ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

Selon un mode de réalisation, on utilise la thérapie génique de manière à cibler les cellules. Pour cela, il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont, entre autres, les cellules infectées par un virus, en particulier un rétrovirus, et/ou les cellules exprimant la protéine PrP.

De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première catégorie implique des techniques physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec

lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et
5 rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des
10 applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme
15 et l'environnement, le risque de mutagenèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte, dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al., 1995 Human Gene
20 Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation des méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux
25 (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (Haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont
30 l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature. Des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes
35 cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait, il a été

montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989
5 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développé de tels lipides
10 cationiques : le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou TransfectamTM (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 Methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAPTM (McLachlan et al., 1995 Gene Therapy 2 :
15 674-622) ou la LipofectamineTM, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autres groupes ont développé des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet
20 WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les documents US-A-5,595,897 et FR 2 719 316, l'utilisation des conjugués polylysine.

25 En fonction de ce que l'on souhaite obtenir *in vivo* pour une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même " ciblé ", comme décrit ci-dessus.

30 Drogues : Ces substances sont administrées en quantités effectives. Les substances peuvent être de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides, des composés chimiques, etc... Les petites

molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des librairies combinatoires chimiques.

Injection : Le matériel biologique défini dans la présente invention peut être administré *in vivo* notamment sous forme injectable. On peut envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent, et selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, en une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle défini. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou du peptide et/ou de la molécule et/ou de la cellule à transférer et/ou de l'organe/tissu cible.

Figures :

La figure 1 montre que huPrP a une activité de molécule chaperonne pour les acides nucléiques.

Figure 1-A : Des oligonucléotides ADN correspondant aux séquences HIV Tar(+) et Tar(-) de 57 nucléotides ont été utilisées. L'ADN Tar(-) a été marqué au P³² et les essais ont été réalisés avec 0.1 pmole des deux ADNs Tar(+) et Tar(-). Les acides nucléiques ont été extraits par protocole phénol-chloroforme bien connu de l'homme de l'art et analysés sur un gel natif 10%.

La piste 1 correspond au contrôle de la réaction d'hybridation à 65°C pendant 30 minutes ;

- la piste 2 correspond à la réaction d'hybridation à 37°C ;

5

- les pistes 3 à 7 correspondent à l'hybridation dirigée par NcP7 ;

10

- les pistes 8 à 12 correspondent à l'hybridation dirigée par huPrP

Les nombres indiquent les rapports moléculaires entre protéine et nucléotide de 1 :192 à 1 :24. La flèche horizontale montre le double brin ADN Tar. Le gel a été exposé pendant 3 heures.

15

Figure 1-B :

L'oligonucléotide Tar(-) radiomarké au P³² a été hybridé avec un ARN HIV-1 3' de 627 nucléotides. Les acides nucléiques ont été extraits par protocole phénol-chloroforme et séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose natif 1%.

20

L'oligonucléotide Tar(-) et les complexes ARN viral : Tar(-) sont indiqués par une flèche.

25

Les pistes 1 à 5 correspondent aux contrôles sans protéines ;

- les pistes 2 à 4 correspondent à l'hybridation dirigée par NcP7 ; et

30

- les pistes 6 à 8 correspondent à l'hybridation dirigée par huPrP.

35

Les nombres indiquent les rapports moléculaires protéine : nucléotide.

La figure 2 montre que huPrP inhibe l'initiation de la transcription inverse.

5 Figure 2-A :

L'ARN HIV-1 5' a été utilisé comme ARN matrice. La transcription inverse a été réalisée en présence de dCTP radiomarqués au P^{32} (Amersham) et les produits ADNc ont été
10 analysés sur gel PAGE-UREE 10%. Les rapports moléculaires protéine : nucléotide sont indiqués sur la figure. La flèche montre la direction de l'électrophorèse et la taille des marqueurs (en nucléotides) sont indiqués sur la gauche.

15 Les pistes 1 à 5 correspondent à la réaction sans protéines ;

- les pistes 2 à 4 correspondent à la réaction avec NCp7 ; et

- les pistes 6 à 8 correspondent à la réaction avec huPrP.

20

Figure 2-B :

Le schéma de cette figure apporte une explication possible pour l'inhibition de l'initiation de la transcription inverse.

25

La Figure 3 montre que huPrP entraîne la dimérisation de l'ARN HIV-1 et l'hybridation de l'amorce tARN^{Lys,3} au site PBS.

L'ARN HIV-1 5' et l'ARNt^{Lys,3} radiomarqué au P^{32} ont été incubés
30 avec ou sans NCp7 ou huPrP et les réactions ont été réalisées. Les rapports moléculaires entre protéine : nucléotide sont indiqués sur la figure. La flèche montre la direction de migration de l'électrophorèse et la taille des marqueurs (en nucléotides) est indiquée sur la gauche. Le monomère HIV-1 et
35 l'ARN dimère, et l'ARNt^{Lys3} sont indiqués sur la droite.

Les pistes 1 et 5 correspondent à la réaction sans protéine ;

- les pistes 2 à 4 correspondent à la réaction avec NCp7 ; et

5

- les pistes 6 à 8 correspondent à la réaction avec huPrP.

Il convient de noter que NCp7 entraîne la formation d'ARN multimère tandis que huPrP ne le fait pas.

10

La figure 4 montre que huPrP dirige l'initiation de la transcription inverse de l'ARN HIV-1.

Figure 4-A :

15

L'ARN HIV-1 5' et l'ARNt^{Lys,3} radiomarké au P³² ont été incubés avec ou sans NCp7 ou huPrP et la transcriptase inverse de HIV p66-p51 a été ajoutée en même temps avec les dNTPs pour permettre l'initiation de la transcriptase inverse. Les réactions ont été réalisées et les ADNc simple brin ont été analysés. Les rapports moléculaires entre protéine : nucléotide sont indiqués sur la figure. La flèche montre la direction de migration de l'électrophorèse et la taille des marqueurs (en nucléotides) est indiquée sur la gauche. L'ADNc simple brin et l'ARNt^{Lys,3} amorce sont indiqués sur la droite.

20

25

Les pistes 1 et 5 correspondent à la réaction sans protéine ;

- les pistes 2 à 4 correspondent à la réaction avec NCp7 ; et

30

- les pistes 6 à 8 correspondent à la réaction avec huPrP.

Figure 4-B :

Cette figure est un schéma pour montrant l'initiation de la transcription inverse et la synthèse d'ADNc simple brin (-).

La figure 5 montre les transferts de brin ADN HIV-1 par huPrP.

5

Pour examiner le transfert de brin de l'ADN (-) HIV-1, de l'ARN HIV-1 3' et 5' matrices et un ADN complémentaire du site PBS radiomarké au P³² (Darlix et al., 1993 ; Allain et al., 1994) ont été utilisés. Pour le transfert du brin + ADN, on a
10 utilisé l'ARN HIV-1 5', l'ARNt^{Lys,3}, une amorce brin + radiomarkée au P³² et un accepteur ADN template (Auxilien et al., 1999). Les réactions ont été réalisées et les ADNc produits ont été analysés. Les rapports moléculaires entre protéine et nucléotide sont indiqués sur la figure. La flèche
15 montre la direction de migration de l'électrophorèse et la taille des marqueurs (en nucléotides) est indiquée sur la gauche.

Figure 5-A : Transfert de brin moins.

20

Les pistes 1 et 5 correspondent à la réaction sans protéine ;

- les pistes 2 à 4 correspondent à la réaction avec NCp7 ; et

25 - les pistes 6 à 8 correspondent à la réaction avec huPrP.

Il convient de noter que le transfert de brin moins est moins efficace avec huPrP (par comparaison des pistes 4 et 8). L'addition de NCp7 et huPrP entraîne un transfert de plus de
30 90%. Le produit de transfert ADNc et l'ADNc simple brin sont indiqués sur la droite.

Figure 5-B : Cette figure est un schéma pour montrer le transfert de l'ADNc(-) simple brin de l'extrémité 5' du génome
35 vers son extrémité 3'.

Figure 5-C : Transfert de brin plus.

La piste 1 correspond à la réaction sans protéine ;

5

- les pistes 2 à 4 correspondent à la réaction avec NCp7 ; et
- les pistes 5 à 7 correspondent à la réaction avec huPrP.

10 Le produit de transfert et l'ADN(+) simple brin sont indiqués sur la droite. Les produits ADN en haut du gel correspondent aux produits auto-amorcés.

Il convient de noter que la quantité de produit de transfert est importante avec huPrP (piste 7).

15

Figure 5-D : Cette figure est un schéma pour montrer le transfert d'ADN(+) simple brin de l'extrémité 3' du génome vers son l'accepteur qui remplace l'ADN brin moins.

20 La figure 6 montre les interactions directes entre huPrP et la nucléoprotéine de HIV-1 in vitro.

La transcriptase inverse de HIV-1, l'intégrase, la NCp7 et huPrP (23-231) ont été séparés par électrophorèse sur un gel
25 SDS-PAGE 13% et électro-transférés sur une membrane de nylon. Les protéines ont été marquées avec huPrP radiomarkée au S³⁵ (TNTsystem, Promega). Les protéines sont :

Pistes 1 (2 µg RTp66-p51), 2 (1 µg Inp32), 3 (1 µg Vpr), 4 et
30 5 : (0.5 et 1 µg NCp7), 6 et 7 (0.5 et 1 µg huPrP). Les marqueurs de protéines en kDA sont montrés sur la droite. L'autoradiographie a été réalisée sur deux jours.

La figure 7 montre que huPrP est incorporée dans les virions
35 HIV-1 et SIV.

Des virions hautement purifiés HIV-1, SIVmac et HTLV-1 ont été donnés par . Arthur (NCI, USA). Les protéines du virion ont été séparées sur gel SDS-PAGE 13% et électro-transférées sur une membrane qui a été ensuite hybridée avec des anticorps monoclonaux 3F4.

Figure 7-A : Coloration du gel au bleu de Coomassie.

10 Figure 7-B : Western blot.

Piste 1 , 10 µg HTLV-1. Piste 2, 6 µg SIVmac. Pistes 3 et 4, 5 et 10 µg HIV-1, respectivement. Les marqueurs de protéines en kDa sont indiqués sur la gauche. La flèche indique huPrP23-
15 231. Des résultats similaires ont été obtenus avec un anticorps polyclonal.

La figure 8 représente l'alignement des séquences nucléotidiques de PrPs provenant, respectivement, de souris, de mouton, de porc, d'humain, de hamster, de chèvre et de bovin.

La figure 9 représente l'alignement des séquences en acides aminés de PrPs provenant, respectivement, de mouton, de chèvre, de bovin, de porc, d'humain, de souris et d'hamster.

25

Exemples :

I. Matériels et méthodes :

I.1. Protéines recombinantes, enzymes, ARNs et plasmides ADN.

30

La protéine recombinante huPrP a été produite dans *E. coli*. Elle correspond à la forme mature PrP^C et est composée des acides aminés 23 à 231. Elle a été purifiée sur colonne de chromatographie et récupérée en éliminant toute trace

contaminante de nucléases, comme décrit par Swietnicki et al. 1998, J Biol Chem 273 : 31048.

La nucléocapside NCp7 de HIV-1 a été synthétisée avec la
5 méthode chimique fmoc/opfp et purifiées par chromatographie
liquide haute pression comme cela a été décrit par de
Rocquigny et al., 1992 PNAS 89 : 6472 ; Cornille et al., 1999
J Pept Res 54 : 427. Les protéines sont resuspendues en tampon
HEPES 30 mM, NaCl 30 mM, ZnCl₂ 0.1 mM pH 6.5 à la concentration
10 de 1 mg /ml.

Les oligonucléotides ADN Tar(-) et Tar(+), longs de 57
nucléotides et correspondant à la séquence HIV-1 pNL4.3, ont
été produits par la société Eurogentec (Belgique).

15 L'ARN 5' de HIV-1 correspondant aux nucléotides 1-415 a été
produit *in vitro*, comme précédemment décrit par Barat et al.,
Embo J 1989, 8 : 3285. L'ARN 3' de HIV-1 (positions 8583-9208
du génome HIV-1) a été préparé avec une queue polyA par
20 transcription, comme décrit par Darlix et al., 1993, Compte
Rendus Acad Sci., Life Sciences 316 : 763. L'ARNt^{Lys,3}
synthétique a été produit *in vitro* en utilisant la polymérase
ARN T7 (Barat et al., 1993 J Mol Biol 231 : 185). La
transcriptase inverse de HIV-1 (RT p66/p51) et l'intégrase
25 Inp32 de HIV-1 ont été purifiées à partir de *E. coli* comme
décrit par Carteau et al., 1997 J Virol 71 : 6225. La
transcriptase inverse du virus MoMuLV purifiée à partir de *E.*
coli a été achetée chez Gibco BRL.

30 PNL4.3 de HIV-1 a été utilisé pour transformer des cellules
293T ou Hela dans les conditions décrites par Ottmann et al.,
J Virol 69 : 1778. Le plasmide pSIV-TGP qui a été construit
est dérivé du génome SIVmac251 (Genbank : numéro d'accèsion
M19499) dans lequel une cassette d'expression GFP contrôlée
35 par le promoteur précoce du cytomegalovirus a été insérée à la

place de la région env 5' et avec un promoteur précoce
cytomegalovirus pCMV qui remplace U3 dans la partie LTR5'. Le
plasmide ADN codant pour la protéine huPrP provient du
laboratoire du Pr D. Dormont (Fontenay). Tous les plasmides
5 ont été amplifiés dans E. coli 1035 (RecA-) et purifiés par
chromatographie d'affinité (protocole Qiagen).

I.2. Virions.

10 Des virions hautement purifiés HIV-1 MN (lots P3592 et P3620,
SIVmac239 (lot 3654) et HTLV-1 (lot P3571) qui ont été
utilisés pour l'étude, ont été produits par centrifugation
différentielle comme décrit par le Dr Larry Arthur (SAIC
Frederick, Frederick MD, USA)

15

I.3. Tests d'hybridation entre acides nucléiques.

Les oligonucléotides ADN correspondant aux séquences Tar(+) et
Tar(-) de HIV-1 de 57 nucléotides ont été utilisés. L'ADN de
20 HIV-1 Tar(-) a été marqué en 5' au P³² et les tests
d'hybridation ont été réalisés avec 0.1 pmole des deux
oligonucléotides ADNs Tar(-) et Tar(+). Les incubations en
présence de huPrP ou de NCp7 ont été réalisées pendant 5
minutes à 37°C dans 10 µl d'une solution contenant du Tris-HCl
25 20 mM, NaCl 30 mM, MgCl₂ 0.2 mM, DTT 5 mM et ZnCl₂ 0.01 mM à pH
7.5. Les essais ont été arrêtés avec du SDS 0.5% et de l'EDTA
10 mM. Les acides nucléiques ont été extraits en présence de
phénol/chloroforme et analysés sur une gel natif de
polyacrylamide 10%.

30

Les réactions avec l'ARN HIV-1 (ARNt marqué au P³²) ou l'ADN
Tar(-) marqué au P³² et huPrP ou NCp7 ont été réalisées pendant
10 minutes à 37°C dans 10 µl de Tris-HCl 20mM, NaCl 30 mM, MgCl₂
0.2 mM, DTT 5 mM, ZnCl₂ 0.01 mM à pH 7.5 en présence de
35 Rnasine 5 unités (Promega), 1.5 pmole d'ARN, 3 pmole d'ARNt et

huPrP ou NCp7 à des quantités permettant d'avoir les rapports indiqués précédemment dans les exemples correspondants. Les réactions ont été arrêtées en présence de SDS-EDTA (0.5%/5 mM), traitées avec de la protéinase K (2 µg) pendant 10 minutes à température ambiante. Les acides nucléiques ont été extraits par la technique à base de phénol/chloroforme, analysés sur gel d'agarose 1.3% en tampon Tris Borate 50 mM pH 8.3 et visualisés après coloration au bromure d'éthidium suivie d'une fixation du gel au TCA 5%, d'un séchage et d'une autoradiographie. Un mélange d'ADN marqueur de poids moléculaire entre 0.16 et 1.77 Kb a été utilisé pour déterminer les tailles des séquences d'ADN visualisées sur gel. Le pourcentage des amorces hybridés à l'ARN HIV-1 a été déterminé en réalisant un balayage densitométrique de l'autoradiographie.

I.4. Protocoles de transcription inverse.

Les réactions ont été schématiquement réalisées comme décrit précédemment par Barat et al., 1989 ; Darlix et al., 1993 ; Allain et al., 1994 Embo J 13 : 973. Après 5 minutes à 30°C dans 10 µl de tampon (voir les protocoles décrits détaillés), le volume de la réaction a été augmenté à 25 µl en ajoutant 2 pmoles de Transcriptase Inverse (RT) de HIV-1 ou de MoMuLV, 0.25 mM de chaque dNTP, 60 mM de NaCl et 2.5 mM de MgCl₂. Après 20 minutes à 37°C, l'incubation a été arrêtée et les produits ont été analysés comme ceux produits par hybridation des acides nucléiques (voir ci-dessus), à l'exception que, après l'extraction au phénol/Chloroforme, les acides nucléiques ont été précipités à l'éthanol, récupérés par centrifugation, dissous dans du formamide, dénaturés à 95°C pendant 2 minutes et analysés sur gel de polyacrylamide 8% en présence d'urée 7M et de Tris-Borate 50mM à pH 8.3. Les marqueurs Hinf ADN marqués au P³² (Promega) ont été utilisés pour la détermination des tailles sur gel. Les taux d'ADNc

synthétisés par la Transcriptase Inverse ont été quantifiés sur scan densitométrique.

Pour les tests de transfert de brin(-), les réactions ont été
5 faites avec 1.5 pmoles d'ARN 5' et 3' et dans les conditions décrites ci-dessus (Allain et al., 1994). Pour le transfert de brin(+), les conditions de la réaction sont exactement celles décrites par Auxilien et al., 1999 J Biol Mol 274 : 4412.

10 I.5. Protocole far Western et Analyse Dot-blot.

Les protéines NCp7 de HIV-1, VPR, RTp66-p51 et Inp32 comme la protéine huPrP (23-231) ont été séparées sur gel de polyacrylamide 13% en présence de SDS et électro-adsorbées sur
15 des membranes de cellulose dans un tampon Tris-Glycine contenant du méthanol 30%. Les membranes ont été saturées avec un tampon de fixation Hepes (HBB : Hepes 25 mM, NaCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM et ZnCl₂ 0.01 mM à pH 7.9) contenant du lait en poudre 5% (w/v) et du NP-40 0.05% pendant 4 heures à 20°C
20 (Lener et al., 1998 J Biol Chem 273 : 33781). Après lavage avec le tampon HBB, la membrane a été hybridée pendant 2 heures à 4°C avec la protéine huPrP synthétisée dans un système réticulocyte de lapin (TNT system, Promega) et radiomarkée au S³⁵. Puis la membrane a été extensivement lavée
25 avec du tampon BPS, séchée et autoradiographiée. Selon un autre procédé, la protéine huPrP à 100 ng /ml a été adsorbée sur la membrane pendant 2 heures à 4°C ; la membrane a été lavée extensivement en PBS et incubée avec des anticorps polyclonaux anti-PrP pour détecter les complexes huPrP-NCp7.
30 Puis la membrane a été de nouveau extensivement lavée en tampon PBS et la détection a été réalisée avec le système ECL commercialisé par Amersham.

Pour les analyses de Dot blot, les protéines virales et la
35 protéine huPrP ont été adsorbées sur une membrane de

nitrocellulose. La membrane a été séchée et les protéines cross-linkées avec elle par irradiation UV (0.1 J/cm²). La membrane a été saturée en HBB en présence de 5% de poudre de lait pendant 4 heures, lavée en HBB et hybridée pendant 4 heures à 4°C avec la protéine huPrP radiomarquée au S³⁵ puis lavée extensivement en tampon PBS. La membrane a été ensuite séchée et autoradiographiée.

1.6. Culture cellulaire, transfection d'ADN et infection virale.

Les cellules HeLa, HeLa P4 et 293 ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% en CO₂ en milieu Dubelcco's modified Eagle's (life technologies-Gibco-BRL) complété avec du sérum de veau fœtal 10%, de la pénicilline (100 Unités Internationales /ml), de la streptomycine (100 µg /ml) et de la L-glutamine 2mM.

Les transfections des cellules ont été réalisées en utilisant un protocole basé sur l'utilisation du phosphate de calcium comme précédemment décrit par Chen C et al., 1987 Mol Cell Biol 7 : 2745. Pour produire du virus SIV en présence ou en absence de la protéine huPrP, les cellules ont été transfectées avec 3 µg de pSIV-TGP, 1.2 µg de pVSV-G avec 3 µg de pADN-huPrPhe. D'autres rapports de plasmides comme 1 µg de pSIV-TGP, 0.3 µg de pVSV-G et 4 µg de pADN-huPrPhe ont été également utilisés. Des conditions expérimentales similaires ont été utilisées avec pNL4.3 de HIV-1 à l'exception que pVSV-G n'a pas été rajouté. Les surnageants contenant les virus ont été récupérés 48 heures après les transfections, filtrés et utilisés pour infecter les cellules. Les quantités de virus produits en présence ou en absence de huPrP par transfection cellulaire ont été mesurées par test Elisa (SIV Cap28 ou HIV Cap24). Des quantités identiques de virus ont été utilisées

pour infecter les cellules 293 (SIV) ou les cellules HeLa-P4 (HIV-1).

Deux jours après l'infection, l'expression virale a été suivie
5 deux jours après par expression LacZ dans les cellules HeLa-P4 (HIV-1) ou par l'expression de GFP par analyse au FACS.

La production des protéines gag de HIV-1 ou de SIV dans les
cellules ou dans les particules virales a été suivie par
10 analyses Western en utilisant des anticorps anti-capside (anti-CA) et la technique de détection ECL commercialisée par Amersham (Tanchou et al., 1998, J Virol 72 : 4442), ou par ELISA (p24). HuPrP dans les cellules 293 ou dans les virions HIV-1, SIV-mac, ou HTLV-1 a été détecté par analyse Western en
15 utilisant soit un anticorps monoclonal 3F4, soit un anticorps polyclonal. Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'extrémité N-terminale, le domaine central ou l'extrémité C-terminale de huPrP ont également été utilisés.

20 II. Résultats

II.1 Fixation de huPrP aux acides nucléiques rétroviraux

Comme la nucléocapside NCp7 de HIV-1, huPrP se fixe aussi bien
aux ARNs (ARN de transfert, ARNs de structure comme l'ARN
25 leader de HIV-1) qu'à l'ADN double brin. De plus, la fixation de huPrP ou de NCp7 aux acides nucléiques conduit à la formation de complexes de haut poids moléculaire qui peuvent sédimenter par centrifugation.

30 L'activité chaperonne de huPrP a été examinée en utilisant l'ADN et l'ARN en parallèle, et en la comparant avec celle décrite pour NCp7 de HIV-1 (Darlix et al., (1995) J. Mol. Biol. 254, 523-537 et Gabus et al., (1998) EMBO J. 17, 4873-4880). Il est en effet connu que NCp7 favorise l'hybridation

de séquences nucléiques comme les séquences très structurées Tar(-) et Tar(+) de HIV-1.

Comme la nucléocapside NCp7 de HIV-1:

5

- huPrP entraîne une hybridation qui conduit à des séquences TAR double brin, de façon dose-dépendante et dans des conditions physiologiques (Figure 1A, pistes 4-7 pour HIV-1 NCp7 et pistes 9-12 pour huPrP);

10

- huPrP entraîne l'hybridation de Tar(-) à la séquence Tar(+) de l'ARN 3', de façon dose dépendante, (Fig 1B voies 3-4 pour NCp7 et 7-8 pour huPrP).

15

Des séquences nucléiques complémentaires issues de virus autres que HIV-1 ou de différentes cellules ont également été utilisées et ont conduit aux mêmes résultats (Figure 1).

20

Ces essais indiquent clairement que huPrP a une activité d'hybridation d'acide nucléique analogue à celle de la protéine NCp7 de HIV-1 et de façon plus générale à celle des nucléocapsides des rétrovirus. La protéine de la nucléocapside (NC) est supposée s'hybrider directement aux acides nucléiques, probablement en facilitant les interactions intermoléculaires tout en prévenant les repliements intramoléculaires. Ceci est illustré par le fait que NCp7 et d'autres protéines NC rétrovirales peuvent inhiber la reverse

25

transcritpion commencée à l'extrémité 3' de l'ARN, un procédé appelé 'Self Priming' (Lapadat et al, 1997) (Fig 2 piste 1).

30

Comme montré dans la figure 2, les deux protéines huPrP et NCp7 peuvent inhiber le Self Priming de la reverse transcription (pistes 2-4 pour NCp7 et pistes 6-8 pour huPrP) (Figure 2).

II.2 Rôle de huPrP dans la dimérisation de l'ARN rétroviral et dans l'hybridation du tARN amorce au site d'initiation de la transcription inverse.

5 Dans la particule virale, le génome rétroviral est sous forme ARN dimérique et présente un site d'initiation de la transcriptase inverse (Primer Binding Site PBS) qui fixe le tARN amorce. La dimérisation de l'ARN génomique et la fixation du tARN amorce au PBS sont induits par la nucléocapside rétrovirale comme cela est connu entre autres avec NCp7 et le
10 génome de HIV-1 (Darlix JL et al., J Mol Biol 1995, 254 : 523). Un système modèle HIV-1 a été mis au point et utilisé *in vitro* pour i) examiner la dimérisation de l'ARN viral et ii) la fixation du tARN amorce au site PBS (Lapadat et al., 1997 ;
15 Gabuset al., Embo J 1998 17 : 4873).

NCp7 est capable de dimériser l'ARN HIV-1 et d'entraîner la fixation du tARN^{Lys,3} amorce au site PBS (Figure 3, pistes 2-4).

20 Comme NCp7, huPrP est responsable de la dimérisation de l'ARN HIV-1 et de la fixation du tARN^{Lys,3} amorce au site PBS, de façon dose dépendante (Figure 3, pistes 6 à 8). Cette observation n'avait jamais été décrite jusqu'à aujourd'hui.

25 Un même système modèle HIV-1 a été mis au point et utilisé *in vitro* pour initier la transcription inverse de l'ARN rétroviral en ADNc à partir du tARN amorce fixé au site PBS.

30 Cette étape a été reproduite *in vitro* à partir de complexes ARN/ARnt en ajoutant au milieu la Transcriptase Inverse (RT) et la nucléocapside NCp7. Ce procédé nécessite la NCp7 (comparaison des pistes 1 et 2-4).

Comme NCp7, la protéine huPrP est capable elle aussi de permettre l'initiation de la transcription inverse par la RT (Figure 4A, pistes 7-8 ; Figure 4B) et est nécessaire à la réalisation de cette étape.

5

II.3 Rôle de huPrP dans le transfert des brins d'ADN pendant la synthèse virale *in vitro*.

Après avoir été synthétisé, le brin- cDNA " stong-stop " (ss-
10 cADN) est transféré à l'extrémité 3' de l'ARN rétroviral qui est nécessaire pour la synthèse complète du brin ADN (voir Figure 5B). Cette étape, connue sous le terme de transfert de brin ADN, est nécessaire pour compléter la synthèse du brin ADN -, et nécessite que i) les séquences R soient présentes à
15 chaque extrémité du génome rétroviral, ii) la transcriptase inverse (RT) avec son activité RNaseH et iii) la protéine de la nucléocapside (NC) (Darlix JL et al., 1995 J Mol Biol 254 : 523). En utilisant un système modèle HIV-1 *in vitro* composé de ARN 5' et 3' qui miment les extrémités 5' et 3' du génome ARN
20 HIV-1, il a été vérifié que la présence de NCp7 est critique pour le transfert de brin (Figure 5A pistes 2-4) et montré pour la première fois que, comme NCp7, la protéine huPrP est capable d'induire *in vitro* le transfert du brin ADN - (pistes 6-8). Cependant ce transfert est moins efficace qu'avec NCp7
25 car des produits d'ADN intermédiaires s'accumulent en même temps que les ADN simples brins entiers (pistes 7-8).

Le second transfert de brin obligatoire pour la synthèse de l'ADN LTR a lieu après l'initiation du brin ADN plus (Figure
30 5B) . En utilisant un autre système modèle HIV-1 *in vitro*, il a été trouvé que la séquence virale PBS, l'ARNt amorce avec les bases modifiées, la transcriptase inverse avec son activité RNaseH et la NCp7 sont nécessaires pour le transfert du brin+ (Figure 6, pistes 2-4) et montré pour la première
35 fois que huPrP était capable de remplacer NCp7 dans le

transfert du brin+ (Figure 6, pistes 2-4) (Auxilien et al., (1999) J. Biol. Chem. 274 : 4412). Cette observation n'a également jamais été décrite jusqu'à présent (Figures 5 et 6).

5 Tous ces résultats indiquent très clairement que la protéine cellulaire huPrP et virale NCp7 ont toutes deux les mêmes fonctions de " chaperonne " d'acides nucléiques qui sont absolument nécessaires à la réplication et la synthèse du
10 l'initiation de la transcription inverse de l'ARN rétroviral et pour l'étape de transfert de brins ADN conduisant à la synthèse d'ADN rétroviral. huPrP et NCp7 peuvent également se compléter entre elles *in vitro*, ce qui suggère qu'elles peuvent interagir.

15

II.4 Fixation de huPrP aux protéines NC.

Des protéines très pures huPrP ou huPrP radiomarquées au souffre isotope 35 (S^{35}) ont été utilisées pour étudier la
20 fixation de huPrP avec la protéine NCp7, dans des expériences de Western blot (Figure 7). En parallèle, la fixation de huPrP à d'autres protéines virales, fixant les acides nucléiques comme Vpr, l'intégrase (IN) et RTp66-p51, a également été étudiée.

25

Il a très clairement été vérifié que huPrP peut se fixer à elle-même (pistes 6-7) pour former des complexes qui sont observés *in vivo* dans le cerveau de malades.

30 Il a par ailleurs été montré pour la première fois que, comme la NCp7, huPrP peut se fixer à NCp7 (pistes 4-5), mais non aux autres protéines RTp66-p51, IN et Vpr (pistes 1-3). Dans les mêmes conditions expérimentales NCp7 interagit avec elle-même et avec la RT de HIV-1 (Tanchou V. et al. J Mol Biol 1995,
35 252 : 563, Lener D. et al. Febs Lett 1995, 361 : 85). D'autres

essais ont été réalisés en utilisant les protéines de la matrice et de la capsid de HIV-1 et de HTLV-1 qui montrent qu'il n'y a aucune interaction entre la protéine huPrP et d'autres protéines de la capsid et de la matrice de HIV-1 et HTLV-1. huPrP se fixe spécifiquement aux nucléocapsides des rétrovirus, et en particulier à NCp7 de HIV-1. Cette observation n'a jamais été décrite jusqu'à aujourd'hui. Les résultats sont présentés aux figures 7 et 8.

Les interactions qui ont lieu entre huPrP et NCp7 de HIV-1 *in vitro* suggèrent que huPrP pourrait être incorporée dans les virions HIV-1.

II.5 Présence de huPrP dans des particules rétrovirales.

La présence de huPrP dans des particules rétrovirales a été étudiée par analyse Western blot en utilisant i) des particules hautement purifiées de virions HIV-1, SIV et HTLV données par l'Institut National du Cancer (L. Arthur, NCI, USA) et ii) un anticorps polyclonal (Demaimay et al 1997 J Virol 71 : 9685) ou monoclonal 3F4 anti-PrP (Kascsak et al., 1987 J Virol 61 : 3688). Deux formes majeures de huPrP ont été retrouvées à 19 et 10 kDa et une forme mineure à 32 kDa dans les deux lots de virions HIV-1 purifiés et utilisés (Figure 8, pistes 3 et 4). Trois formes majeures de huPrP ont été retrouvées à 19, 16 et 10 kDa et une forme mineure à 32 kDa dans les virions purifiés de SIV (piste 2). Parallèlement huPrP n'a pas été retrouvée dans les particules HTLV (piste 1). La quantité de huPrP totale dans les particules HIV et SIV a été quantifiée par ELISA et comparée avec celle de la protéine de la capsid (CA). Les résultats montrent qu'environ 150 molécules de huPrP sont présentes par particule virale, en prenant en compte le fait qu'environ 2500 molécules de protéines de la capsid (protéine-CA) sont présentes par virion.

II.6 Influence de huPrP sur la production de particules virales et sur l'infectivité de virions.

- 5 La présence de différentes formes de huPrP dans des virions HIV-1 et SIV-mac suggère que cette protéine cellulaire pourrait influencer la production de virus et l'infectivité virale.
- 10 L'influence de la surexpression de huPrP sur la production et sur l'infectivité de HIV-1 a été examinée en culture cellulaire. Des cellules 293 T (Didier Thono CHU Genève, Suisse) ont été utilisées pour vérifier cette hypothèse car elles expriment physiologiquement un faible taux de protéine
- 15 huPrP, comme montré par des analyses de Western blot et d'immunocytochimie. Ces cellules ont été co-transfectées avec des plasmides codant respectivement pour HIV-1 et huPrP. Deux jours après la transfection les virions de HIV-1 produits en présence ou en absence de huPrP ont été collectés et la
- 20 production de virions a été analysée par ELISA et Western blot. Des virions produits dans des conditions de surexpression de huPrP ont été trouvés sous forme mature. L'infectivité de HIV-1 a été suivie par détection de l'expression de LacZ dans les cellules Hela-P4. Les résultats
- 25 montrent que pour un rapport huPrP :HIV-1 ADN de 1 :1 la production de particules virales étaient réduite d'environ trois fois et l'infectivité du virus était réduite d'environ 3 fois. Pour un rapport huPrP :HIV-1 ADN de 5 :1, la production virale était réduite d'environ cinq fois et l'infectivité du
- 30 virus était diminué de 5 à 6 fois pour un simple cycle de réplication. Ces résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous.

Pour co-exprimer SIV et huPrP, les cellules 293 ont été

35 transfectées avec trois plasmides recombinants qui expriment

i) SIVmac avec la protéine GFP à la place de env, ii) VSV-G pour pseudo-typer les virions SIVmac et iii) la protéine huPrP, respectivement. Le taux de transfection des cellules a été vérifié par analyse au FACS et la quantité de virions produits SIVmac a été mesurée, en présence ou en absence de huPrP, en utilisant un test ELISA mesurant la CAp28. L'infectivité des virus recombinants SIVmac produits en présence ou en absence de huPrP a été analysée par FACS des cellules exprimant la GFP, deux ou trois jours après l'infection avec le SIVmac pseudotypé par VSV-G. Les résultats de cinq jeux d'expériences réalisés avec deux rapports différents de huPrP :SIV montrent que huPrP a une influence négative à la fois sur la production de virions et sur l'infectivité virale. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. Pour un rapport huPrP : SIV de 1 : 1, la quantité de particules virales produites est d'environ 2 à 3 fois moindre et l'infectivité est diminuée de 3 fois pour un seul cycle de réplication. Pour un rapport de huPrP : SIV égal à 1 : 5, l'infectivité virale est diminuée de 5 à 10 fois.

20

Tableau

ADN	Production (protéine-CA)	Infectivité
HIV-1	100	100
huPrP :HIV-1 (1 :1)	35+/-5	35+/-5
huPrP :HIV-1 (5 :1)	20+/-4	15+/-4
SIVmac/VSV-G	100	100
huPrP :SIV-1 (1 :1)	30+/-5	35+/-5
huPrP :SIV-1 (5 :1)	--	15+/-3

Les nombres donnés correspondent à des valeurs moyennes d'au moins cinq jeux d'expériences. Dans les deux cas, l'infectivité par les lentivirus était d'environ 10^6 unités

infectieuses par ml de milieu. Tous les contrôles ont été arbitrairement fixés à 100%.

Les inventeurs ont donc montré très clairement pour la
5 première fois que huPrP a une influence négative sur la production des virions par les mêmes cellules et sur l'infectivité du virus.

La diminution de la production rétrovirale et de l'infectivité
10 des virions peut s'expliquer par une compétition entre la nucléocapside du rétrovirus infectant la cellule et la protéine cellulaire huPrP pour se fixer aux acides nucléiques du rétrovirus et induire la réplication et la synthèse du
génom viral. La surexpression de huPrP favorise la fixation
15 de la protéine avec le génome rétroviral au détriment de la fixation du génome avec la propre nucléocapside virale. La réplication du génome viral serait perturbée et moins efficace avec huPrP par rapport à NCp7, même si ces deux protéines
présentent les mêmes fonctions. Les particules nouvellement
20 produites par la cellule surexprimant huPrP contiennent elles-mêmes la protéine huPrP. La protéine peut entrer dans une nouvelle cellule lors de l'infection rétrovirale et augmenter la concentration de cette protéine dans la cellule, permettant
là encore une influence négative de cette protéine sur la
25 production de nouvelles particules virales et leur infectivité. On pourrait comprendre de cette façon comment une protéine peut être responsable de la propagation de la maladie. En fait cette propagation serait due à la protéine, médiée par une infection rétrovirale (ou d'autres virus).

Références bibliographiques sur les séquences nucléiques et protéiques de PrP et de NCp7.

PrP

- Huang Z et al., PNAS 1994 91 : 7139
- Lehmann S et al., J Biol Chem 1995 270 : 24589
- Puckett C et al. Am J Hum Genet 1991 49 : 320
- Kretzschmar HA et al., DNA 1986 5 : 315
- Lee IY et al., Genome Res 1998 8 : 1022
- Liao YC et al., Science 1986 233 : 364

NCp7

- Huang Y et al., J Virol 1997 71 : 4378
- Schmalzbauer E et al., J Virol 1996 70 : 771
- Morellet N et al., Embo J 1992 11 : 3059

REVENDEICATIONS

1. Protéine à prion PrP^c ou PrP^{sc}, humaine ou animale isolée,
5 caractérisée en ce qu'elle est capable de se fixer à de l'ADN
ou à de l'ARN, en particulier à de l'ADN ou à de l'ARN viral
et de préférence à de l'ADN ou à de l'ARN de rétrovirus
humains ou animaux.
- 10 2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce
qu'elle est capable de se fixer à l'ARN ou à l'ADN d'un virus,
tel que les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O, de groupe
non M non O, le virus HIV-2, le virus SIV, les virus
enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus,
15 les Filovirus et les Paramyxovirus.
3. Protéine à prion PrP^c ou PrP^{sc}, humaine ou animale,
caractérisée en ce qu'elle est capable de se fixer à une
protéine de nucléocapside d'un rétrovirus humain ou animal.
- 20 4. Protéine selon la revendication 3, caractérisée en ce
qu'elle est capable en particulier de se fixer à la
nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1.
- 25 5. Analogue de Ncp7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une
protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Complexe nucléoprotéique isolé qui comprend une protéine à
prion, PrP^c ou PrP^{sc}, humaine ou animale, associée à de l'ADN
30 ou à de l'ARN, en particulier à de l'ADN ou à de l'ARN viral
et de préférence à de l'ADN ou à de l'ARN de rétrovirus
humains ou animaux.
7. Complexe nucléoprotéique selon la revendication 6, dans
35 lequel la protéine à prion est la PrP^c ou la PrP^{sc} humaine ou

animale, associée à l'ARN ou à l'ADN d'un virus, tel que les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O, de groupe non M non O, le virus HIV-2, le virus SIV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les
5 Paramyxovirus.

8. Complexe protéique isolé qui comprend une protéine à prion, PrP^{sc} et/ou PrP^{sc}, humaine ou animale, associées à elles mêmes ou entre elles et/ou à une protéine de nucléocapside d'un
10 rétrovirus humain ou animal.

9. Complexe protéique selon la revendication 7, dans lequel la PrP^{sc} ou PrP^{sc} est associée en particulier à la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1.
15

10. Protéine à prion PrP^c ou PrP^{sc} selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, sous forme modifiée ou sous forme d'un fragment d'au moins l'une de ces protéines, pour une utilisation comme agent antiviral, éventuellement en
20 interaction avec un ligand susceptible de se fixer à ladite PrP^c ou PrP^{sc}, tel qu'une protéine, un polypeptide, un acide nucléique, une molécule chimique, une drogue, un vecteur.

11. Protéine ou fragment de protéine selon la revendication
25 10, caractérisée en ce qu'elle ou il consiste en une protéine ou un fragment de protéine naturel, isolé ou en une protéine ou un fragment de protéine recombinante ou en un polypeptide ou fragment polypeptidique de synthèse.

30 12 Composition thérapeutique et/ou prophylactique caractérisée en ce qu'elle comprend, une quantité efficace d'un agent anti-viral selon les revendication 10 ou 11, avec éventuellement un adjuvant et/ou un diluant et/ou un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

35

13. Acide nucléique codant pour une PrP^c ou une PrP^{Sc} modifiée ou pour au moins un fragment d'au moins l'une de ces protéines selon la revendication 10 ou 11, pour une utilisation comme agent anti-viral.

5

14. Acide nucléique selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il code pour une protéine ou un fragment d'une protéine, naturelle ou recombinante, ou en ce qu'il est le produit de la transcription d'un acide nucléique ou d'un fragment d'acide
10 nucléique selon la revendication 13.

15. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent anti-viral selon les
15 revendications 13 ou 14.

16. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, une cassette d'expression fonctionnelle dans une cellule issue d'un organisme procaryote
20 ou eucaryote permettant l'expression de l'ADN ou de l'ARN, ou d'un fragment d'ADN ou d'ARN, codant pour tout ou partie d'une protéine PrP^c ou d'une PrP^{Sc} modifiée selon la revendication 13, et éventuellement permettant l'expression de l'ADN ou de l'ARN, ou d'un fragment d'ADN ou d'ARN, codant pour tout ou
25 partie d'un ligand de ladite PrP^c ou PrP^{Sc} modifiée, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son ou leur expression.

17. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, un vecteur comprenant une
30 cassette d'expression selon la revendication 16.

18. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, une cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote comprenant une cassette

d'expression selon la revendication 16 ou un vecteur selon la revendication 17.

19. Utilisation d'une cassette d'expression selon la
5 revendication 16, ou d'un vecteur selon la revendication 17 ou d'une cellule selon la revendication 18, comme agent anti-viral.

20. Cassette d'expression fonctionnelle dans un vecteur viral
10 fonctionnel pour transduire des cellules issues d'un organisme eucaryote permettant l'expression de l'ADN ou d'un fragment d'ADN codant pour tout ou partie d'une protéine PrP^C ou PrP^{sc} modifiée selon la revendication 13, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et permettant la
15 répllication d'un acide nucléique viral, en particulier rétroviral recombinant, tel que les acides nucléiques des virus HIV-1 de groupe M, de groupe O, de groupe non M non O, du virus HIV-2, du SIV, des virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les
20 Paramyxovirus.

21. Vecteur comprenant une cassette d'expression selon la revendication 20.

22. Cellule transformée, issue d'un organisme eucaryote,
25 comprenant une cassette d'expression et de répllication selon la revendication 20 ou un vecteur selon la revendication 21.

23. Cellule selon la revendication 22, caractérisée en ce
30 qu'elle est notamment choisies parmi les cellules eucaryotes 293, les cellules HeLa et HeLa P4, les cellules souches humaines ou animales.

24. Composition thérapeutique et/ou prophylactique,
35 caractérisée en ce qu'elle comprend, une cellule selon les

revendications 22 et 23, ou un vecteur selon la revendication 21 ou une cassette d'expression selon la revendication 20.

25. Utilisation d'une cellule selon les revendications 22 et
5 23, ou un vecteur selon la revendication 21 ou une cassette d'expression selon la revendication 20, comme agent anti-viral.

26. Procédé de détection et/ou de quantification d'une
10 infection par un virus, en particulier un rétrovirus humain ou animal, selon lequel :

(i) on prélève un échantillon biologique humain ou animal, tel qu'un fluide biologique, une cellule ou un fragment
15 tissulaire,

(ii) on détecte ladite PrP^c ou PrP^{sc} dans ledit échantillon biologique, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier viral et de préférence rétroviral, ou
20 encore associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 de HIV-1,

(iii) on détecte ladite PrP^c ou PrP^{sc} de l'étape (ii), et

25 (iv) si souhaité on quantifie la concentration de ladite PrP^c ou PrP^{sc} de l'étape (ii) par rapport à une concentration de référence.

27. Procédé selon la revendication 26, selon lequel on détecte
30 et éventuellement quantifie ladite PrP^c ou PrP^{sc} sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier viral, de préférence rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, à l'aide d'au moins un ligand, en
35 particulier un anticorps et de préférence un anticorps

monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} sous forme libre ou dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou à une protéine de nucléocapside rétrovirale.

28. Procédé selon la revendication 27, selon lequel on utilise un deuxième anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} sous forme libre ou associée.

29. Kit pour la détection d'une infection par un virus, en particulier un rétrovirus humain ou animal, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins un ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc}, sous forme libre, ou dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier viral, de préférence rétroviral ou à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la NCp7 de HIV-1, et éventuellement un deuxième anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} sous forme libre ou associée, différent dudit premier épitope.

30. Particule virale isolée, en particulier particule d'un rétrovirus humain ou animal, tel que le virus HIV-1 de groupe M, de groupe O, de groupe non M non O, le virus HIV-2, le virus SIV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus, et comprenant une protéine PrP^c ou une protéine PrP^{sc} telle que définie dans la revendication 1 ou dans la revendication 3.

31. Procédé de détection et/ou de quantification d'une maladie à prions selon lequel :

(i) on prélève un échantillon biologique humain ou animal, tel qu'un fluide biologique, une cellule ou un fragment tissulaire,

5

(ii) on isole ou extrait et purifie des particules virales, en particulier rétrovirales, à partir dudit échantillon biologique,

10 (iii) on lyse lesdites particules virales de façon à obtenir un lysat, et

(iv) on détecte une PrP, de préférence la PrP^{sc} dans ledit lysat, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou de l'ARN
15 viral, de préférence rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside rétrovirale, en particulier la nucléocapside NCp7 de HIV-1, et

(v) si souhaité, on quantifie ladite PrP, de préférence ladite
20 PrP^{sc}, sous forme libre ou associée.

32. Procédé selon la revendication 31, dans lequel lesdites particules virales sont des particules telles que définies dans la revendication 30.

25

33. Procédé selon les revendications 31 et 32, selon lequel on détecte et éventuellement quantifie ladite PrP, de préférence ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN viral, de préférence rétroviral, ou associée à une
30 protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 de HIV-1, à l'aide d'au moins un ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^{sc} sous forme libre ou dirigé contre au moins un premier
35 épitope de ladite PrP^c ou PrP^{sc} associée à de l'ADN ou à de

l'ARN, en particulier à de l'ADN ou à de l'ARN viral, et de préférence rétroviral ou à une nucléocapside d'un rétrovirus.

34. Procédé selon la revendication 33, selon lequel on utilise
5 un deuxième anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope de ladite PrP, de préférence ladite PrP^{sc} sous forme libre ou associée, différent dudit premier épitope.

10 35. Kit pour la détection et/ou la quantification d'une maladie à prions, caractérisé en ce qu'il comprend, entre autres, au moins un ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope d'une PrP, de préférence une PrP^{sc}, sous forme
15 libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier à de l'ADN ou à de l'ARN viral, et de préférence rétroviral ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 de HIV-1, dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP, de préférence PrP^{sc} et
20 éventuellement un deuxième anticorps, de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre un deuxième épitope, différent dudit premier épitope, de ladite PrP, de préférence PrP^{sc} sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, en particulier viral, et de préférence rétroviral ou associée à
25 une nucléocapside rétrovirale, en particulier à la nucléocapside NCp7 de HIV-1.

36. Composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie à prions,
30 caractérisée en ce qu'elle comprend, un agent thérapeutique constitué par un ligand capable de se lier à ladite PrP, de préférence PrP^{sc}, en particulier un anticorps polyclonal ou monoclonal ou un fragment d'anticorps et de préférence un anticorps ou fragment d'anticorps monoclonal, ou constitué par
35 un acide nucléique codant pour un anticorps polyclonal ou

monoclonal ou pour un fragment d'anticorps et de préférence pour un anticorps ou un fragment d'anticorps monoclonal ou l'agent thérapeutique est une molécule anti-virale.

5 37. Composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie à prions, caractérisée en ce qu'elle comprend, une drogue choisie parmi l'A.Z.T (Azido Deoxythymidine), D.D.I. (DiDeoxylsine).

10 38. Utilisation d'une composition thérapeutique et/ou prophylactique selon l'une quelconque des revendications 36 à 37 pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie à prions.

15 39. Utilisation d'une composition thérapeutique et/ou prophylactique selon la revendication 24, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie à prions.

20 40. Procédé pour mettre en évidence une surexpression de la protéine PrP^c ou de la protéine PrP^{sc} et la diminution d'une infection virale *in vitro*, en particulier une infection rétrovirale par un rétrovirus humain ou animal selon lequel :

25 (i) on transforme une cellule avec un acide nucléique codant pour un rétrovirus et un acide nucléique codant pour une PrP^c ou PrP^{sc} d'origine humaine ou animale, en particulier un plasmide,

30 (ii) on réalise une culture cellulaire de ladite cellule dans un milieu de culture approprié, on détecte la production de virions dans le surnageant de culture de ladite culture cellulaire et, (iii) on corrèle ladite production de virion avec une production de virion effectuée dans les mêmes conditions mais en l'absence de PrP^c ou PrP^{sc}.

35

41. Procédé selon la revendication 40, dans lequel la cellule est notamment choisie parmi les cellules 293, les cellules HeLa et HeLa P4, les cellules souches humaines ou animales et l'acide nucléique rétroviral est l'acide nucléique d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

42. Procédé de détection et/ou de quantification de l'expression d'une protéine PrP^c ou PrP^{sc} et de l'expression d'au moins une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus, selon lequel on utilise au moins un premier ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et au moins un deuxième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

43. Procédé selon la revendication 42, selon lequel on utilise un troisième ligand, en particulier un anticorps et de

préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope, de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et/ou au moins un quatrième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

44. Kit pour la détection et/ou la quantification de l'expression d'une protéine PrP^c ou PrP^{sc} et de l'expression d'au moins une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus, comprenant au moins un premier ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et au moins un deuxième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de

groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV, les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

5

45. Kit selon la revendication 44, comprenant un troisième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope, de ladite PrP^c ou de ladite PrP^{sc}, sous forme libre ou associée à de l'ADN ou à de l'ARN, de préférence viral et en particulier rétroviral, ou associée à une protéine de nucléocapside d'un rétrovirus, en particulier la nucléocapside NCp7 du rétrovirus HIV-1, et/ou au moins un quatrième ligand, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre au moins un deuxième épitope, différent du premier épitope d'une protéine virale, de préférence rétrovirale et en particulier d'un rétrovirus choisi parmi les virus HIV-1 de groupe M, de groupe O ou de groupe non M, non O, le virus HIV-2, le virus SIV, le virus BIV, le virus VISNA, le virus CAEV les virus enveloppés, tels que le virus de la rougeole, les Rhabdovirus, les Filovirus et les Paramyxovirus.

20

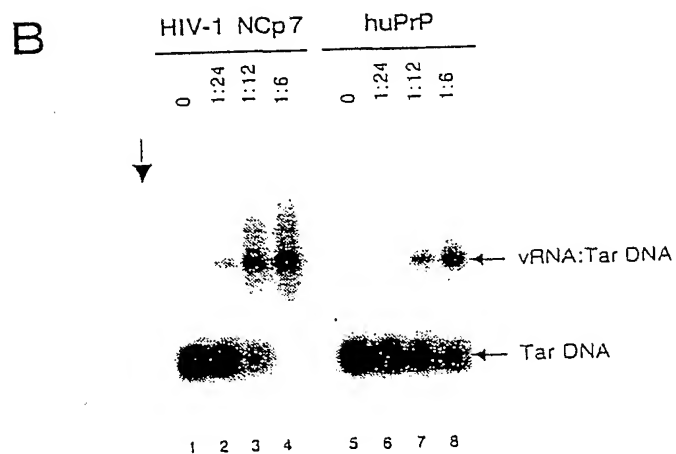
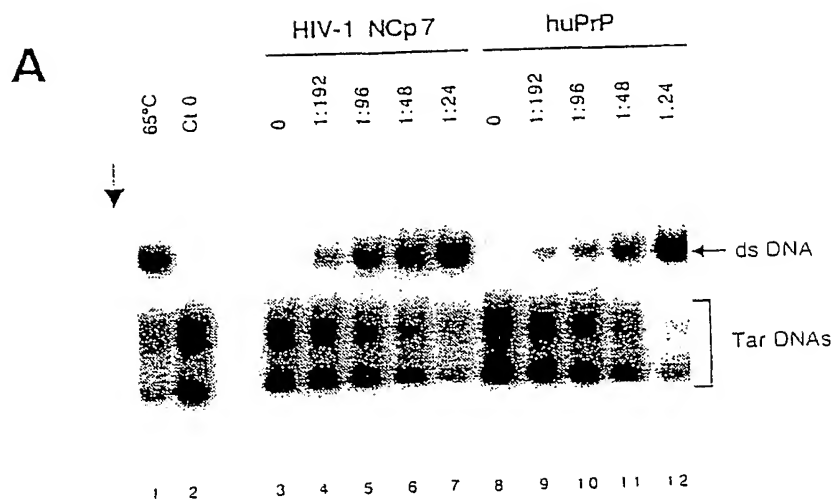


Figure 1

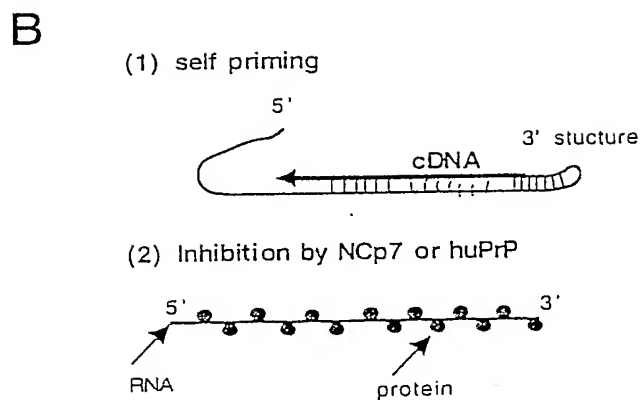
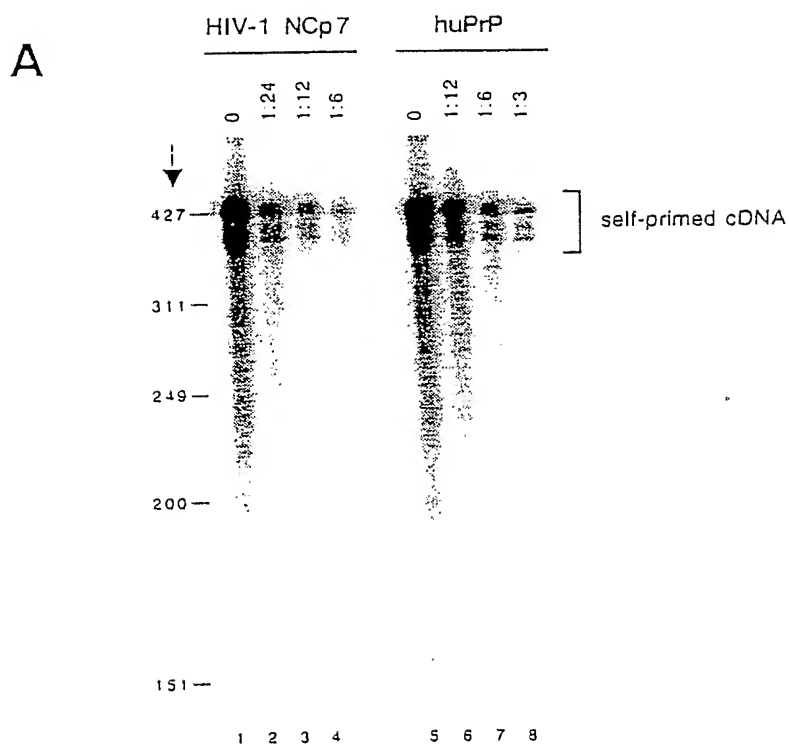


Figure 2

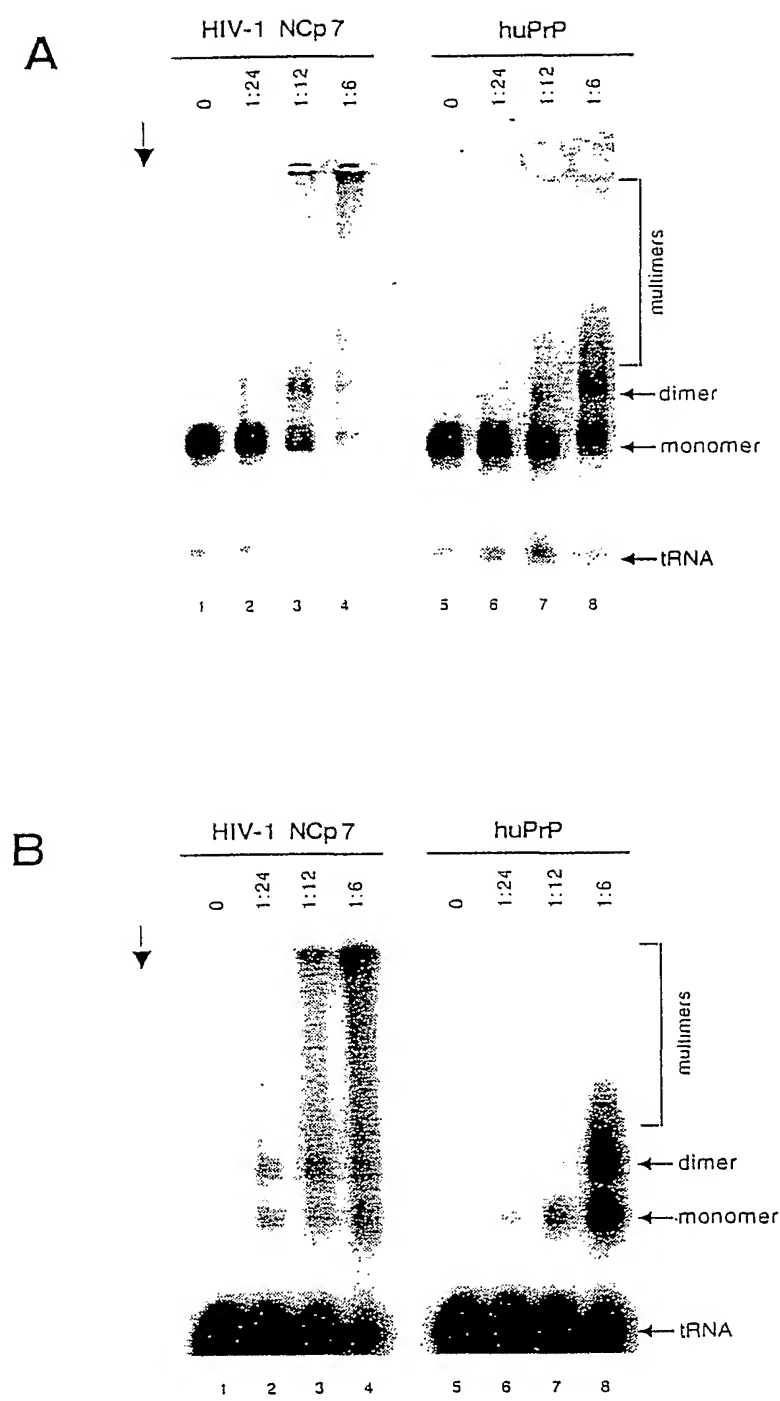


Figure 3

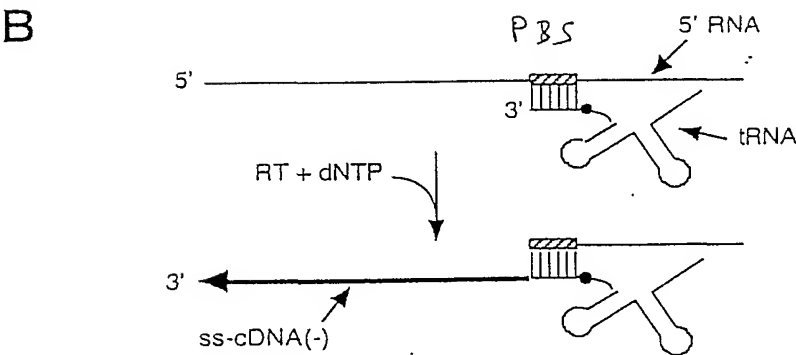
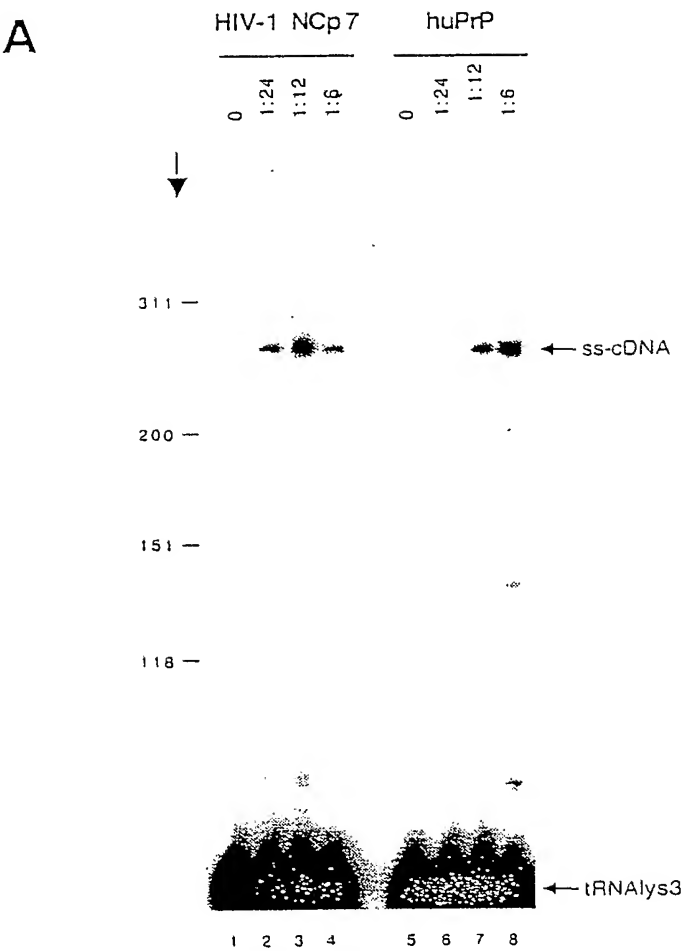
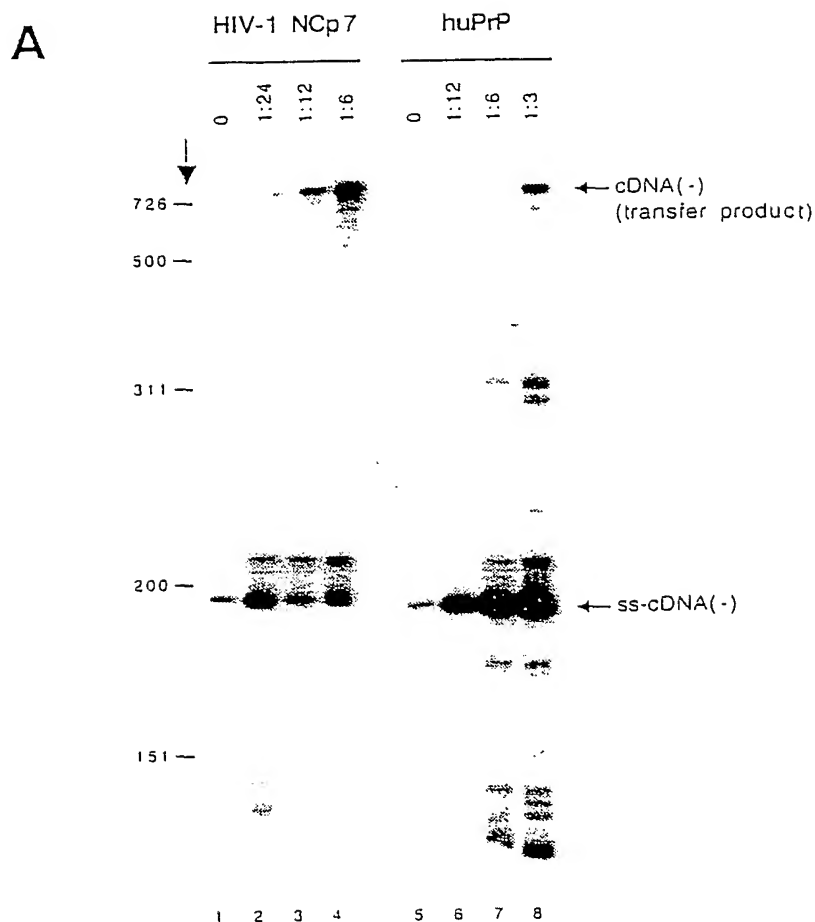
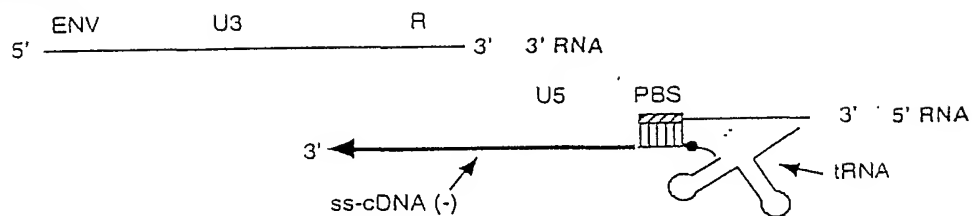


Figure 4



B

(1) Initiation



(2) 5'-3' Transfer and elongation

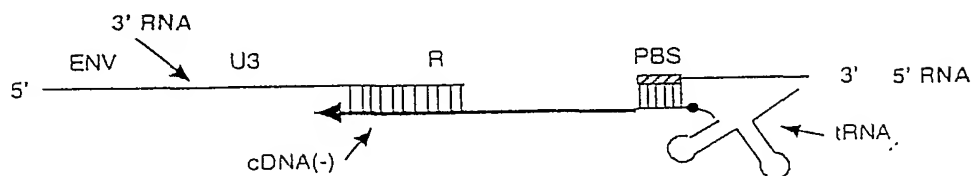


Figure 5

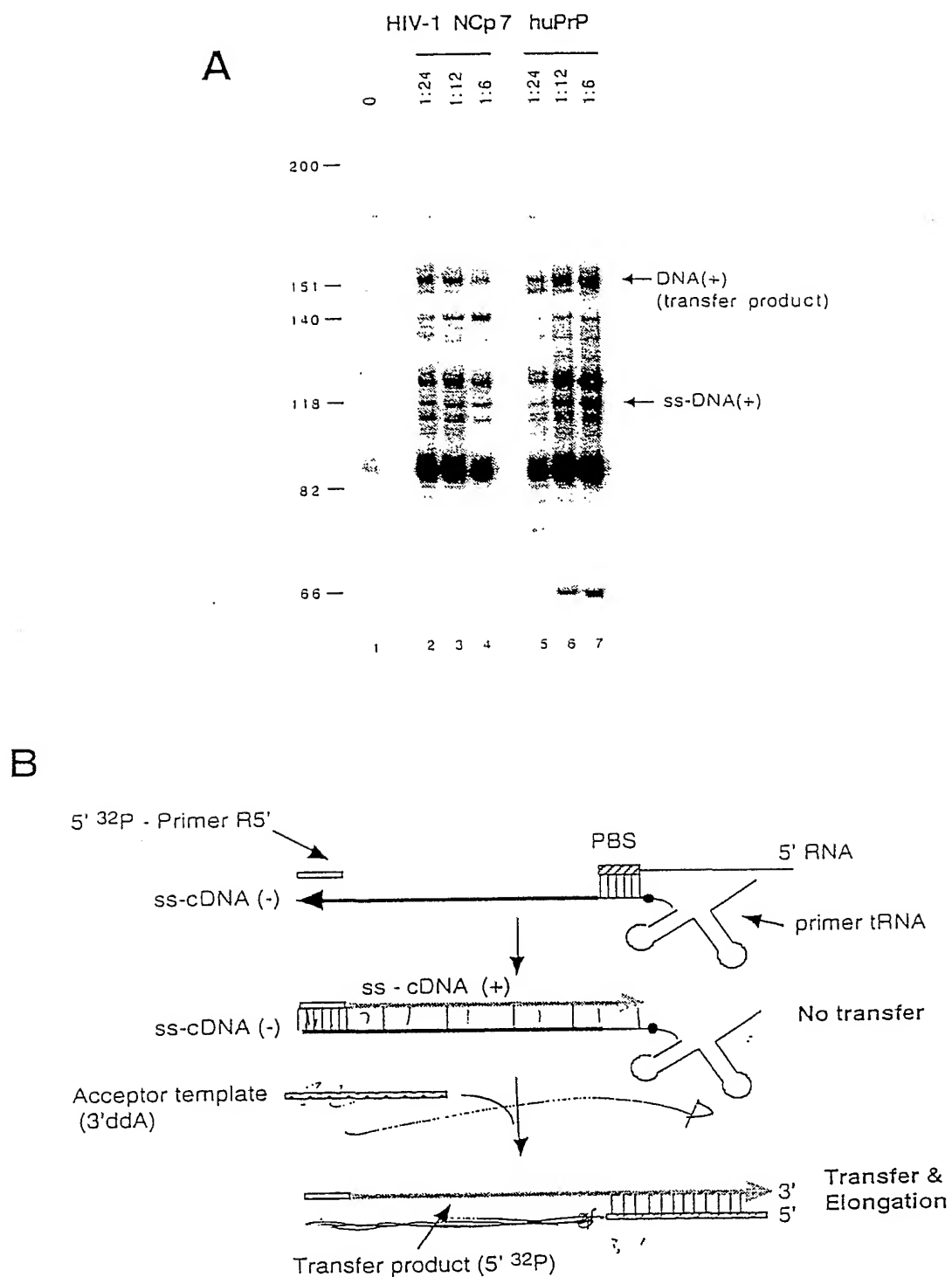


Figure 6

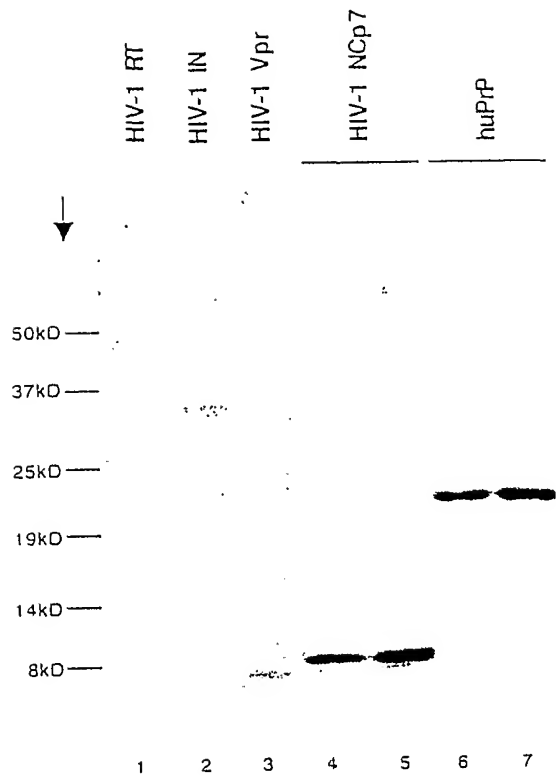


Figure 7

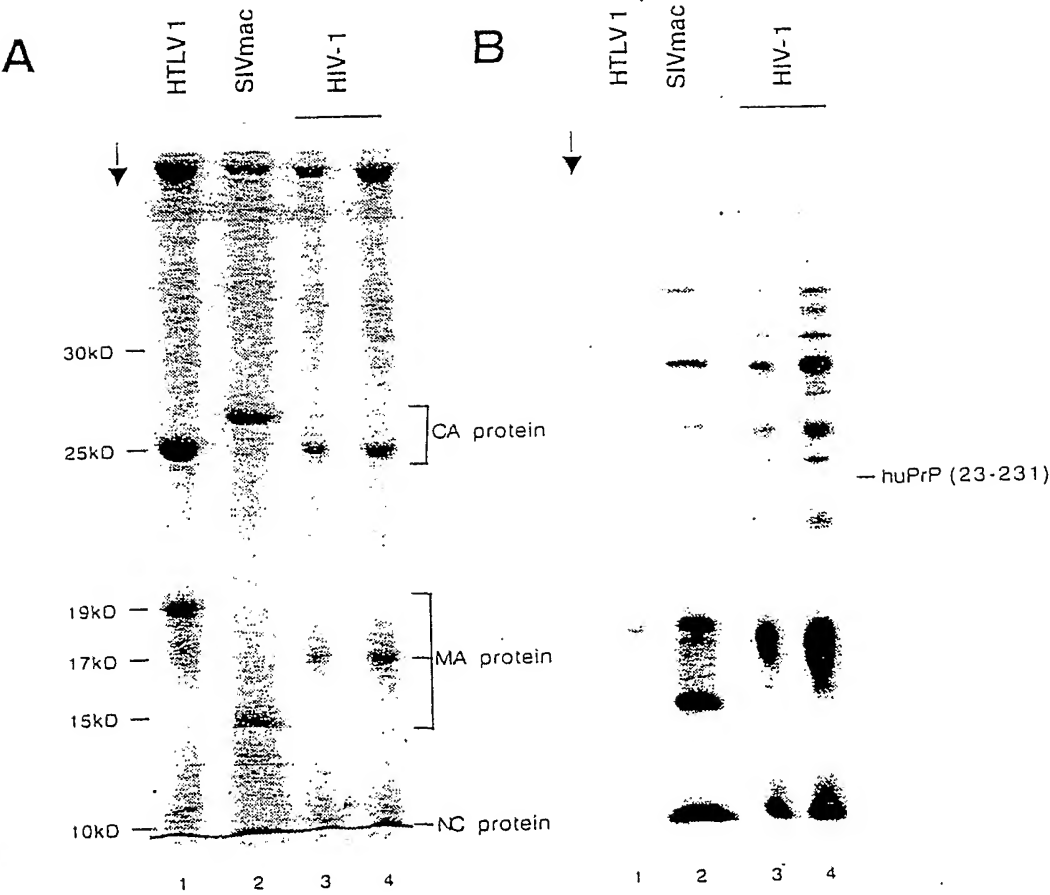


Figure 8

9/10

```

138 PRIO_SHEEP HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
139 PRIO_COAT HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
140 PRIO_BOVIN HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
141 PRIO_PIG HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
142 PRIO_HUMAN --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
143 PRIO_MOUSE --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
144 PRIO_HOUSE --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
145 PRIO_HAMSTER --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
146 ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150
138 PRIO_SHEEP HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
139 PRIO_COAT HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
140 PRIO_BOVIN HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
141 PRIO_PIG HVKSHIGSWILVLFVAHNSDVLCKKRPKPGGHNTPGGSFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
142 PRIO_HUMAN --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
143 PRIO_MOUSE --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
144 PRIO_HOUSE --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
145 PRIO_HAMSTER --KMHILGCMWLVLFVAHNSDVLCKKRPKPGG--HNTGGSRYPFGGSGFPGCHRYPPQGGGCHGPHIGGCHQPHIGG-----GKGGPHIGGGGGGCGG--SHSQHNATSKPKTH---HKIIVAGAAAAAAGAVVGGGCGGYHLGSAHS
146 ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150
256 PRIO_SHEEP RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
257 PRIO_COAT RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
258 PRIO_BOVIN RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
259 PRIO_PIG RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
260 PRIO_HUMAN RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
261 PRIO_MOUSE RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
262 PRIO_HOUSE RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
263 PRIO_HAMSTER RPLIHFGHDYEDRYRENHYRPHQVYRPFVQYSHQNHNFVIDCVHITVKQHTVTTTKEHFTETDIKIHENVVEQHCITQYQRESQAYYO--RGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG
264 ruler 1.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270

```

FIGURE 9